

***Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím,
aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.***

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



Signalizace adenylátcyklázového toxinu
bakterie *Bordetella pertussis* v makrofázích

Signalization of adenylate cyclase toxin
of *Bordetella pertussis* in macrophages

Bc. Ondřej Černý

Školitel: Mgr. Jana Kamanová, PhD.

Tato práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením Mgr. Jany Kamanové, PhD.

Místo:

Podpis

Na tomto místě bych chtěl poděkovat
mé školitelce *Janě Kamanové*
Jiřímu Mašínovi
a vedoucímu laboratoře *Peteru Šebovi*
za cenné rady a všechnu pomoc při vypracovávání této práce.

Děkuji.

Prostředky vynaložené na tuto práci byly hrazeny z grantů:
Výzkumný záměr AV0Z50200510
Grant IAA500200914 Grantové Agentury AV ČR
Grant GA310/08/0447 Grantové Agentury České republiky
Grant 1M0506 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy

Souhrn

Adenylátcyklázový toxin je klíčovým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje onemocnění černý kašel. Primárním cílem tohoto toxinu v hostitelském organismu jsou myeloidní fagocytické buňky nesoucí integrin CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, CR3, Mac-1). Již dříve bylo ukázáno, že CyaA inhibuje zvýšením hladiny cytosolického cAMP schopnost makropinocytózy a fagocytózy v buňkách. Tato práce se zabývá studiem signální dráhy, která je zodpovědná za inhibici makropinocytózy právě přes zvýšenou vnitrobuněčnou koncentraci cAMP.

Pomocí specifických aktivátorů proteinové kinázy A (PKA) a proteinu Epac jsme ukázali, že za inhibici makropinocytózy v buňkách je zodpovědná zvýšená vnitrobuněčná hladina cAMP, která dále vedla k aktivaci proteinu Epac. Dále jsme prokázali, že transfekce makrofágů konstitutivně aktivní variantou proteinu Rap1 (efektorem proteinu Epac) vedla k inhibici makropinocytózy. Naopak, exprese dominantně negativní varianty Rap1 vyvolala zvýšení makropinocytózy. Dále jsme ukázali, že inhibice jak tyrozinových fosfatáz, tak proteinové fosfatázy 2A (PP2A) vedla k obnově makropinocytózy, která byla před tím inhibovaná zvýšenou hladinou cAMP v buňkách. Získané výsledky naznačují, že signalizace cAMP přes proteiny Epac/Rap1, případně přes proteinovou fosfatázu 2A a tyrozinové fosfatázy vede k inhibici makropinocytózy. Dále jsme ukázali, že signalizace proteinu Epac společně s PKA, vedla ke snížení aktivační fosforylace Akt kinázy na Ser 473 a Thr 308. Již dříve bylo ukázáno, že inhibice Akt kinázy (proteinové kinázy B) vede k inhibici produkce oxidu dusnatého v buňkách. My jsme ukázali, že působení CyaA již v koncentracích od 5 ng/ml vede k inhibici produkce NO v makrofázích.

Klíčová slova: Adenylátcyklázový toxin, *Bordetella pertussis*, cAMP, makropinocytóza, Akt kináza, buněčná signalizace

Summary

Adenylate cyclase toxin (CyaA) is a key virulence factor of *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough. The toxin targets primarily myeloid phagocytes expressing CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, CR3, Mac-1) and by elevation of cytosolic cAMP levels it paralyzes their macropinocytic and opsono-phagocytic functions. Here, we dissected the cAMP-regulated pathway responsible for the block of macrophage macropinocytosis and characterized the capacity of CyaA-treated macrophages to shut-down Akt (protein kinase B, PKB) signaling; that controls nitric oxide (NO) production by macrophages.

By using specific activators of protein kinase A (PKA) and for the exchange protein activated by cAMP (Epac), we show that activation of the cAMP effector Epac inhibits macropinocytosis in macrophages. Moreover, upon transfection of macrophages by the constitutively active and dominant negative variants of a downstream effector of Epac, the small GTPase Rap1, inhibition or upregulation of macrophage macropinocytosis was observed, respectively. It was reported previously that the Epac/Rap1 pathway regulates activity of tyrosin phosphatase SHP-1 as well as of protein phosphatase 2 A (PP2A). We show that inhibition of both tyrosin phosphatases and PP2A interferes with CyaA-mediated block of macropinocytosis. These findings thus indicate a role of the cAMP/Epac/Rap1/phosphatase pathway in the control of macropinocytosis in macrophages. We further report here that signaling of both, Epac as well as PKA in CyaA-treated macrophages leads to inhibition of Akt kinase (protein kinase B, PKB), as determined by the level of its phosphorylation on Ser 476 and Thr 308. Moreover, exposition of macrophages to CyaA at concentrations as low as 5 ng/ml inhibited their capacity to produce NO, revealing for the first time a CyaA-mediated subversion of reactive nitrogen intermediate (RNI) generation in macrophages.

Keywords: Adenylate cyclase toxin, *Bordetella pertussis*, cAMP, macropinocytosis, Akt kinase, cellular signalization

Obsah:

1	Seznam zkratk	- 5 -
2	Úvod a cíle práce	- 7 -
3	Literární přehled	- 11 -
3.1	Rod <i>Bordetella</i>	- 11 -
3.1.1	<i>Bordetella pertussis</i>	- 12 -
3.1.1.1	Faktory virulence	- 13 -
3.1.1.2	Adenylátcyklázový toxin	- 16 -
3.2	Makrofágy	- 22 -
3.2.1	Signalizace cAMP v makrofázích	- 26 -
3.2.1.1	Proteinová kináza A	- 28 -
3.2.1.2	Protein Epac	- 29 -
3.2.2	Makropinocytóza	- 31 -
4	Materiál a metodika	- 34 -
4.1	Materiál	- 34 -
4.1.1	Přístroje	- 34 -
4.1.2	Chemikálie	- 35 -
4.1.3	Plazmidy	- 37 -
4.1.4	Seznam enzymů	- 38 -
4.1.5	Seznam protilátek	- 38 -
4.1.6	Kultivační média	- 39 -
4.1.7	Pufry a roztoky	- 40 -
4.1.8	Bakteriální kmeny	- 45 -
4.1.9	Tkáňové linie	- 46 -
4.2	Metodika	- 46 -
4.2.1	Produkce CyaA v bakteriích <i>E. coli</i> BL21/pMM 100	- 46 -
4.2.2	Izolace CyaA z inkluzních tělísek	- 47 -
4.2.3	Purifikace CyaA pomocí DEAE-Sepharosy	- 47 -
4.2.4	Purifikace CyaA pomocí Phenyl-Sepharosy	- 48 -
4.2.5	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	- 49 -
4.2.6	Stanovení koncentrace proteinů (metoda podle Bradfordové)	- 49 -
4.2.7	Stanovení množství LPS	- 49 -
4.2.8	Stanovení koncentrace cAMP v cytozolu buněk po jejich vystavení CyaA	- 50 -
4.2.9	Příprava superkompetentních buněk	- 51 -
4.2.10	Transformace bakterií metodou teplotního šoku	- 51 -
4.2.11	Minipreparace plazmidové DNA	- 52 -
4.2.12	Minipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO	- 52 -
4.2.13	Midipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO	- 53 -
4.2.14	Stanovení koncentrace DNA	- 53 -
4.2.15	Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu	- 53 -
4.2.16	Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz	- 54 -
4.2.17	Fenol-chloroformová extrakce plazmidové DNA	- 54 -
4.2.18	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	- 54 -
4.2.19	Elektroforéza v agarózovém gelu	- 55 -
4.2.20	Práce s buněčnou linií RAW 264.7	- 55 -

4.2.20.1	Příprava buněčných konzerv.....	- 56 -
4.2.20.2	Rozmrazování buněčných konzerv	- 56 -
4.2.20.3	Stanovení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce.....	- 56 -
4.2.21	Příprava lyzátu buněk <i>E. coli</i>	- 56 -
4.2.22	Stanovení makropinocytózy u RAW 264.7 makrofágů	- 57 -
4.2.23	Měření produkce oxidu dusnatého	- 58 -
4.2.24	Western blot	- 59 -
4.2.25	Transfekce RAW 264.7 makrofágů	- 60 -
5	Výsledky	- 61 -
5.1	Produkce a purifikace rekombinantního toxinu CyaA.....	- 61 -
5.2	Analýza mechanismu inhibice makropinocytózy makrofágů prostřednictvím CyaA	- 63 -
5.2.1	Produkce cAMP toxinem CyaA inhibuje makropinocytózu.....	- 63 -
5.2.2	Inhibice makropinocytózy toxinem CyaA je zprostředkována působením proteinu Epac	- 65 -
5.2.3	Aktivace proteinu Rap1 vede ke snížení schopnosti makropinocytózy, zatímco jeho inhibice makropinocytózu aktivuje	- 67 -
5.2.4	Působení CyaA na makropinocytózu je zprostředkováno buněčnými fosfatázami	- 70 -
5.2.5	Působení CyaA vede k inhibici kinázy S6K	- 72 -
5.3	Analýza regulace Akt kinázy prostřednictvím CyaA.....	- 74 -
5.3.1	CyaA inhibuje Akt kinázu prostřednictvím zvýšení hladiny buněčného cAMP	- 74 -
5.3.2	Akt kináza je inhibována procesem odlišným od inhibice makropinocytózy a není ovlivněna inhibicí fosfatáz	- 76 -
5.3.3	Akt kináza je inhibována působením PKA i proteinu Epac.....	- 78 -
5.3.4	Působení CyaA nevede k deaktivaci PDK1 kinázy, ani ke snížení stability fosfatázy PTEN	- 80 -
5.3.5	CyaA inhibuje produkci NO u neaktivovaných i aktivovaných makrofágů	- 82 -
6	Diskuze	- 84 -
6.1	Analýza mechanismu inhibice makropinocytózy prostřednictvím CyaA.-	- 84 -
6.2	Analýza regulace Akt kinázy prostřednictvím CyaA.....	- 86 -
7	Souhrn	- 89 -
8	Použitá literatura	- 91 -

1 Seznam zkratek

6-Bnz-cAMP	N ⁶ -Benzoyl-cAMP
8-CPT-cAMP	...	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP
AC	adenylátcyklázová doména CyaA
AGC rodina	rodina serin/threoninových kináz pojmenovaná podle kináz A, G a C
AKAP	protein zakotvující proteinovou kinázu A, z angl. „A-kinase anchoring protein“
Akt	serin/threoninová kináza, proteinová kináza B
Amp	ampicilin
APS	amoniumpersulfát
ATP	adenosintrifosfát
pb	páry bází
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BFB	bromfenolová modř
BSA	hovězí sérový albumin
Bvg	dvousložkový regulační systém
BvgS	senzorový protein systému Bvg
BvgA	regulační protein systému Bvg
cAMP	3',5'-cyklický adenosinmonofosfát
CA	konstitutivně aktivní varianta proteinu, z angl. „constitutively active“
cGMP	3',5'-cyklický guanosinmonofosfát
CyaA	adenylátcyklázový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
CyaA-AC ⁻	mutovaná varianta CyaA neschopná přeměny ATP na cAMP
CyaA-E570K+E581P	mutovaná varianta CyaA neschopná tvořit póry v membráně cílové buňky a neschopná translokace AC domény do cytozolu cílové buňky
CyaC	acetyltransferáza bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
DEAE	diethylamino ethyl
db-cAMP	N ⁶ , 2'- O- Dibutyryladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate
DC	dendritické buňky
DMEM	médium používané pro tkáňové kultury, z angl. „Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	dimethylsulfoxid
DN	dominantně negativní varianta proteinu, z angl. „dominant negative“
DNT	dermonekrotický toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	epiteliální NO syntáza
Epac	protein aktivovaný vazbou cAMP, z angl. „exchange protein activated by cAMP“
FcR	receptor vázající Fc část imunoglobulinů zodpovědný za fagocytózu částic opsonizovaných protilátkami
FHA	filamentózní hemaglutinin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
FITC-dextran	fluoresceinisothiokyanát konjugovaný na dextran
GAP	protein aktivující GTPázovou aktivitu, z angl. „GTPase activating protein“
GEF	faktor vyměňující GDP za GTP, z angl. „guanine nucleotide exchange factor“

GM-CFU	prekurzor makrofágů, z angl. „colony forming unit granulocyte-macrophage“
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
H-89	N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina
IL	interleukin
INF	interferon
iNOS.....	inducibilní NO syntáza
Km.....	kanamycin
LB médium	médium Luria-Bertani
LPS	lipopolysacharid, bakteriální endotoxin
MDO médium ..	živné médium pojmenované z francouzského „moyenne densité optique“ médium
mTOR.....	mTOR kináza, z angl. „mammalian target of rapamycin“
MVL5	pozdní antigen makrofágů, z angl. „macrophages very late antigen-5“
NP-40	Nonidet P-40
PAK.....	kináza aktivovaná proteinem p21, z angl. „p21 activated kinase“
PCR	polymerázová řetězová reakce, z angl. „polymerase chain reaction“
PDE	fosfodiesterázy, z angl. „phosphodiesterase“
PDK1	kináza závislá na fosfoinositidech, z angl. „phosphoinositide dependent kinase 1“
PH.....	PH doména, z angl. „pleckstrin homology domain“
PHLPP.....	fosfatáza obsahující PH doménu, z angl. „PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase“
PI3K	fosfatidylinositol 3 kináza, z angl. „phosphoinositide 3 kinase“
PIP3	fosfatidylinositol(3,4,5)-trisfosfát, z angl. „phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate“
PKA.....	proteinová kináza A
PKC.....	proteinová kináza C
PP	proteinová fosfatáza
PTEN.....	duální fosfatáza, z angl. „phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10“
PTX	pertusový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
RA	Ras asociovaná doména proteinu Epac
REM	doména proteinu Epac pojmenovaná z angl. „Ras Exchange Motif“
RPMI.....	médium používané pro tkáňové kultury, poprvé připravené v „Roswell Park Memorial Institute“
RTX.....	motiv vyskytující se v bakteriálních toxinech, z angl. „repeat-in-toxin“
SDS-PAGE.....	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SH2.....	doména homologní k proteinu Src
T1SS.....	sekreční systém typu I
Tcf	tracheální kolonizační faktor bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TCT	tracheální cytotoxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethan
TGF	transformační růstový faktor
TLR	receptor patřící do rodiny toll
TNF	faktor nekrotizující nádory, z angl. „tumor necrosis factor“
vag.....	geny aktivované v bakteriích <i>Bordetella pertussis</i> ve virulentní fázi
vrg	geny suprimované v bakteriích <i>Bordetella pertussis</i> ve virulentní fázi
WT	varianta proteinu bez mutace, tzv. divoká varianta, z angl. „wild-type“

2 Úvod a cíle práce

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) je faktorem virulence bakterie *B. pertussis* nezbytný pro její schopnost přežít v hostitelském organismu. CyaA se váže pravděpodobně primárně na myeloidní fagocytické buňky exprimující integrin CD11b/CD18. Adenylátcyklázový toxin se skládá ze 1 706 aminokyselinových zbytků. Je schopen tvořit malé kation-selektivní kanály v plazmatické membráně buněk. Jeho další schopností je doprava N-koncové adenylátcyklázové domény do cytozolu cílové buňky. Tato doména je aktivována vazbou cytozolického kalmodulinu, což jí umožňuje tvorbu vysokého množství cAMP z ATP.

Je známo, že bakteriální toxiny jsou schopny regulovat buněčnou signalizaci pomocí různých mechanismů. Schopnost adenylátcyklázového toxinu produkovat cAMP narušuje celou řadu baktericidních mechanismů fagocytických buněk. Z dřívějšího výzkumu v naší laboratoři je známo, že je to právě adenylátcyklázová aktivita CyaA, která je zodpovědná za inhibici makropinocytózy u makrofágů. Nedávno bylo v literatuře popsáno několik rozdílných způsobů, kterými může změna hladiny cAMP v cytozolu makrofágů inhibovat jejich baktericidní schopnosti. Pro tyto procesy je důležitá Akt kináza, která je již z dřívějšíka známá svou rolí v řadě signalizačních kaskád zastoupených ve velkém množství imunologických procesů, jako je například produkce NO.

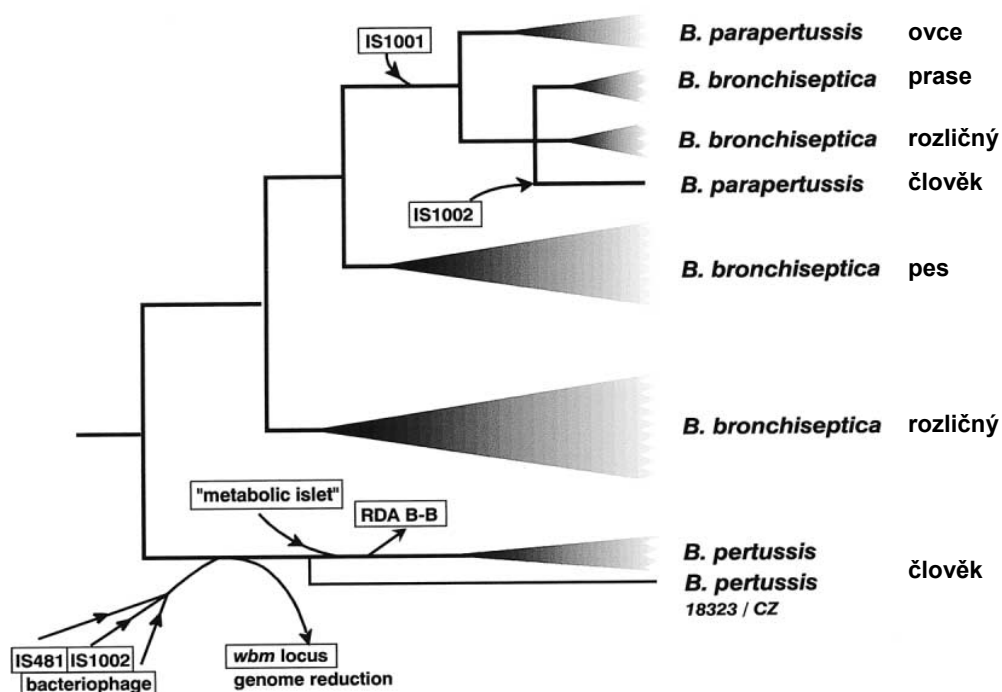
Cíle této diplomové práce byly následující:

- 1) Popsat mechanismus inhibice makropinocytózy adenylátcyklázovým toxinem
- 2) Analyzovat regulaci Akt kinázy prostřednictvím adenylátcyklázového toxinu a studovat vliv adenylátcyklázového toxinu na schopnost makrofágů produkovat oxid dusnatý

3 Literární přehled

3.1 Rod *Bordetella*

Rod *Bordetella* zahrnuje několik druhů obligátně aerobních bakterií způsobujících více či méně závažná onemocnění. Výjimkou je *B. petrii*, fakultativně anaerobní bakterie izolovaná z půdy (von Wintzingerode et al., 2001), která byla teprve nedávno izolována z klinického vzorku (Fry et al., 2005). *B. trematum* kolonizuje kůži lidí. Ostatní druhy rodu *Bordetella* kolonizují dýchací cesty savců a ptáků, kde mohou způsobit závažná onemocnění. Pro humánní medicínu je ze zástupců rodu *Bordetella* nejdůležitější *Bordetella pertussis*. Dalšími významnými patogenními zástupci rodu *Bordetella* jsou *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*. Tento druh vznikl procesem reduktivní speciace z předchůdce podobného bakterii *B. bronchiseptica*. V průběhu tohoto procesu docházelo pravděpodobně ke ztrátě genů potřebných pro kolonizaci širšího spektra hostitelů. Dnes je proto *B. pertussis* řazena do takzvaného „klastru *B. bronchiseptica*“ (Gerlach et al., 2001), jehož schématické znázornění je na obr. 1.



Obr. 1: Schématické znázornění „klastru *B. bronchiseptica*“ založené na distribuci inzerčních elementů v genomu. U některých linií je vyznačen preferovaný hostitel daného bakteriálního druhu. Převzato a upraveno podle Gerlach et al. (2001).

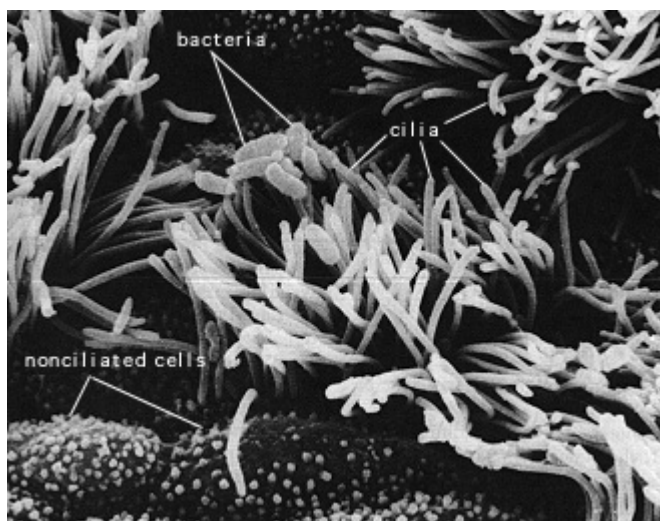
3.1.1 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je striktně lidský patogen bez známého zvířecího hostitele, a nevyskytuje se ve vnějším prostředí. *B. pertussis* způsobuje onemocnění známé jako černý kašel (dávivý kašel, pertuse) a šíří se mezi hostiteli kapénkovou infekcí. Ačkoli je černý kašel obvykle označován jako typicky dětská nemoc, může *B. pertussis* také kolonizovat dýchací cesty dospělých lidí. U těch způsobuje chronický kašel (Birkebaek et al., 1999). Na obr. 2 je zobrazena bakterie *B. pertussis* adherující k řasinkovým buňkám dýchacího epitelu.

Inkubační doba černého kašle se obvykle pohybuje mezi 7 a 10 dny. Po této době následuje u neimunizovaných dětí onemocnění trvající obvykle 6 až 12 týdnů, nebo i déle. Obvykle probíhající onemocnění má tři fáze: katarální, paroxysmální a rekonvalescenční. Katarální fáze začíná jako mírný kašel doprovázený rýmou a zvýšeným slzením, podobně jako je tomu u rhinovirové infekce. Tato fáze obvykle trvá 7 až 14 dní. Paroxysmální fázi charakterizuje silný kašel v průběhu jednoho výdechu (paroxysmus). Období rekonvalescence, které následuje po odstranění infekce, je dlouhé a vyznačuje se postupně se snižující frekvencí a silou paroxysmů.

U infekcí bakterií *Bordetella pertussis* výjimečně dochází také k jejímu rozšíření do plic pacienta. Nedochází ale k rozšíření bakterie do krevního oběhu popřípadě do ostatních tělních orgánů. V některých případech vede onemocnění černým kašlem k patologickým změnám v mozku nemocného. Zdá se ale, že tato poškození jsou spíše způsobená hypoxií a poškozením mozku následkem nedostatku kyslíku při záchvatech paroxysmu, než přímým působením bakterie (Mattoo a Cherry, 2005).

Infekce bakterií *Bordetella pertussis* vede k lokální imunosupresi, což usnadňuje vstup následných sekundárních infekcí a způsobuje závažné komplikace černého kašle.

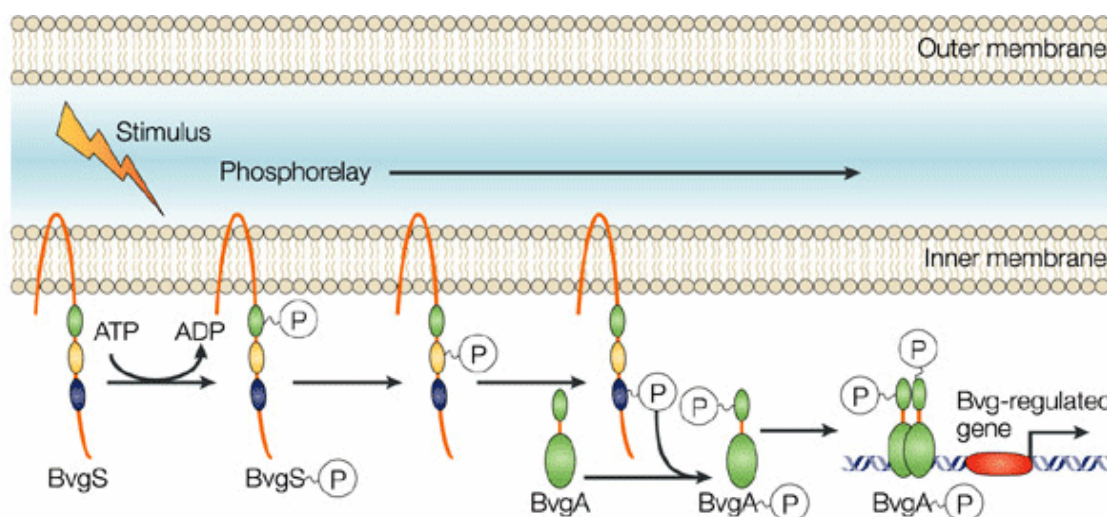


Obr. 2: Bakterie *Bordetella pertussis* adhezuje k řasinkovým buňkám dýchacího epitelu lidí. (textbookofbacteriology.net)

3.1.1.1 Faktory virulence

Genom bakterie *Bordetella pertussis* kóduje pouze 11 druhově-specifických genů (Cummings *et al.*, 2004). Na druhou stranu produkuje tato bakterie celou řadu faktorů virulence a většina z nich je produkována také ostatními patogenními druhy rodu *Bordetella* (Preston, 2005).

Produkce většiny faktorů virulence bakterie *B. pertussis* závisí na takzvané „fázové variaci“. Regulace produkce faktorů virulence je řízena dvousložkovým regulačním systémem Bvg [shrnutí v práci Preston *et al.* (2004), viz obr. 3]. Vnitřní bakteriální membránou prochází histidinová kináza BvgS, která je po aktivaci autofosforylována a následně je fosfo-skupina přenesena podél cytoplazmatické domény BvgS. Posléze je tato fosfo-skupina přenesena na protein BvgA. BvgA je DNA-vazebný protein a aktivuje transkripci genů důležitých pro virulenci bakterie (vags, z anglického „virulence-activated genes“), což bakterii činí virulentní – nachází se ve „virulentní fázi“, nazývané také jako „Bvg⁺ fáze“. Při přenosu bakterie do nízké teploty nebo v přítomnosti nikotinové kyseliny nebo síranových iontů přechází *B. pertussis* do takzvané „Bvg⁻ fáze“, během které je exprimována jiná sada genů – takzvané „virulenci reprimované geny“ (vrgs, z anglického „virulence-repressed genes“).



Obr. 3: Schéma přenosu signálu podél dvousložkového regulačního systému Bvg. Po detekci stimulačního signálu v periplasmě dochází k autofosforylaci histidinové kinázy BvgS a k přenosu fosfoskupiny podél její cytoplasmatické domény. Následně je fosfoskupina přenesena na protein BvgA. BvgA je transkripční regulátor a po jeho fosforylaci dochází k expresi vag genů. Převzato a upraveno z Preston *et al.* (2004).

Faktory virulence exprimované bakterií *Bordetella pertussis* v Bvg⁺ fázi mohou být rozděleny do dvou skupin – na adheziny a toxiny (obr. 4). Za adheziny jsou obvykle označovány filamentózní hemagglutinin, proteiny fimbrií, pertaktin, tracheální kolonizační faktor a pertusový toxin. Mezi toxiny bývají řazeny endotoxin (LPS), tracheální cytotoxin, dermonekrotický toxin, pertusový toxin a adenylátcyklázový toxin.

Hlavním adhezinem bakterie *B. pertussis* je filamentózní hemagglutinin (FHA), který umožňuje *B. pertussis* vázat se na celou řadu extracelulárních buněčných struktur v dýchacích cestách hostitele (exprimovaných na příklad na epitelálních buňkách nebo makrofázích) (Saukkonen *et al.*, 1991).

Kromě FHA exprimuje *B. pertussis* proteiny Fim2, Fim3 a FimD. Fim2 a Fim3 jsou hlavní stavební složkou fimbrií. FimD je pak lokalizován na konci fimbrie. Fimbrie umožňují vazbu proteinu MVL5 (z angl. „macrophages very late antigen-5“) (Geuijen *et al.*, 1997).

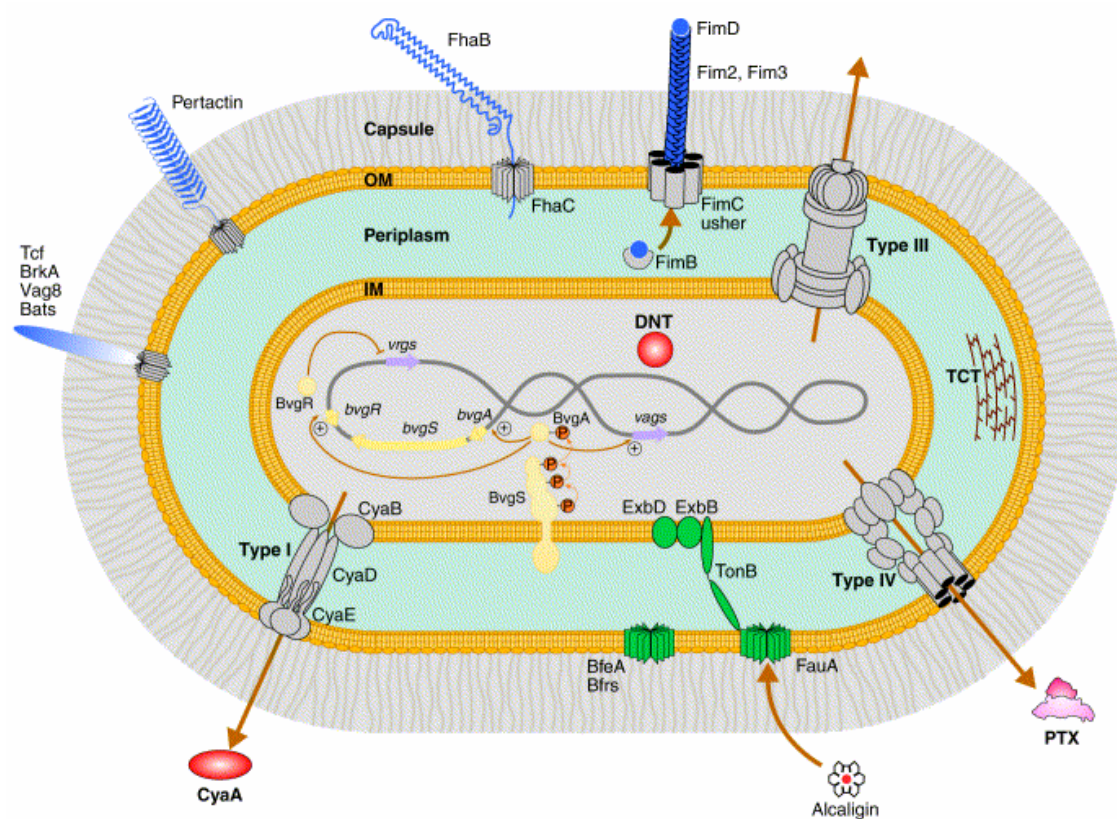
Autotransporterový protein pertaktin a tracheální kolonizační faktor zvyšují schopnost *B. pertussis* vázat se na dýchací epitel.

Pertusový toxin (PTX) může být klasifikován jednak jako adhezín, jednak jako toxin. PTX má klasickou strukturu AB₅ toxinů a je složen z polypeptidů S1 (tvoří část A) a S2, S3, S4 a S5, které v poměru 1 : 1 : 2 : 1 tvoří část B₅ (Hazes *et al.*, 1996). PTX nese ADP-ribozylační aktivitu, která způsobuje inhibici α podjednotky trimerních G_i

proteinů poté, co PTX vstoupí po endocytóze do cytozolu hostitelské buňky. ADP-ribozylovaný G_i protein pak není schopný inhibovat buněčné adenylátcyklázy, což vede k nárůstu vnitrobuněčné hladiny cAMP (Locht a Antoine, 1995).

LPS izolovaný z *B. pertussis* je pyrogenní a toxický podobně jako endotoxin izolovaný z *E. coli* (Watanabe *et al.*, 1990). Tracheální cytotoxin (TCT) je produkován jako peptidoglykan a způsobuje poškození řasinkových buněk dýchacího epitelu. Toto poškození způsobuje nadměrná produkce oxidu dusnatého buňkami dýchacího epitelu po jejich vystavení TCT (Heiss *et al.*, 1994).

Dermonekrotický toxin (DNT) vstupuje do hostitelské buňky endocytózou závislou na dynaminu. Následně je aktivovaný proteázou furinem (Matsuzawa *et al.*, 2004). Poté, co je DNT aktivován, je schopen deaminovat nebo polyaminovat malé GTPázy rodiny Rho, což vede k jejich konstitutivní aktivaci.



Obr. 4: Faktory virulence bakterie *Bordetella pertussis*. Adheziny filamentózní hemaglutinin (FhaB a FhaC), fimbrie (Fim2, Fim3 a FimD), pertaktin a tracheální kolonizační faktor (Tcf) jsou zobrazeny modře. Toxiny mezi které patří dermonekrotický toxin (DNT), pertusový toxin (PTX) a adenylátcyklázový toxin (CyaA) jsou zobrazeny červeně. Tracheální cytotoxin (TCT) je zobrazen hnědě. Převzato a upraveno z Locht *et al.* (2001).

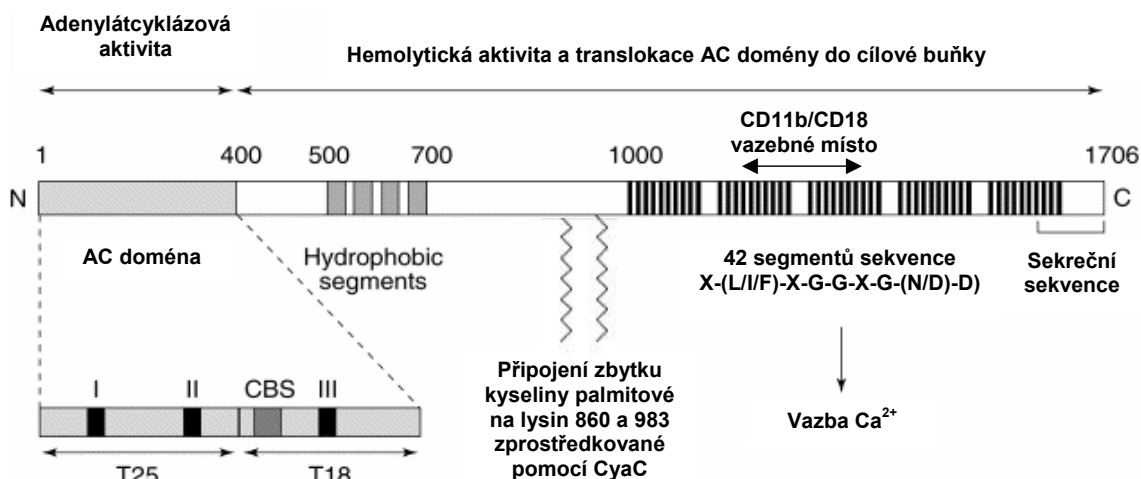
3.1.1.2 Adenylátcyklázový toxin

Adenylátcyklázový toxin (označován jako CyaA, ACT, AC-Hly nebo AC-toxin) je důležitým faktorem virulence bakterie *B. pertussis* (Weiss *et al.*, 1984). Důležitost toho toxinu v rané fázi infekce bakterií *B. pertussis* byla ukázána v mnoha pracích (Gueirard *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1992; Khelef *et al.*, 1992; Goodwin a Weiss, 1990). Tento toxin produkují také všechny ostatní druhy „klastru *B. bronchiseptica*“.

Adenylátcyklázový toxin je unikátní svojí schopností pronikat přímo skrz plazmatickou membránu cílové buňky a přenášet přes ni svoji katalytickou doménu do cytozolu cílové buňky aniž by muselo předtím dojít k endocytóze toxinu. Tato schopnost byla poprvé ukázána pro bakteriální toxiny právě na modelu CyaA (Gordon *et al.*, 1988).

3.1.1.2.1 Struktura molekuly CyaA

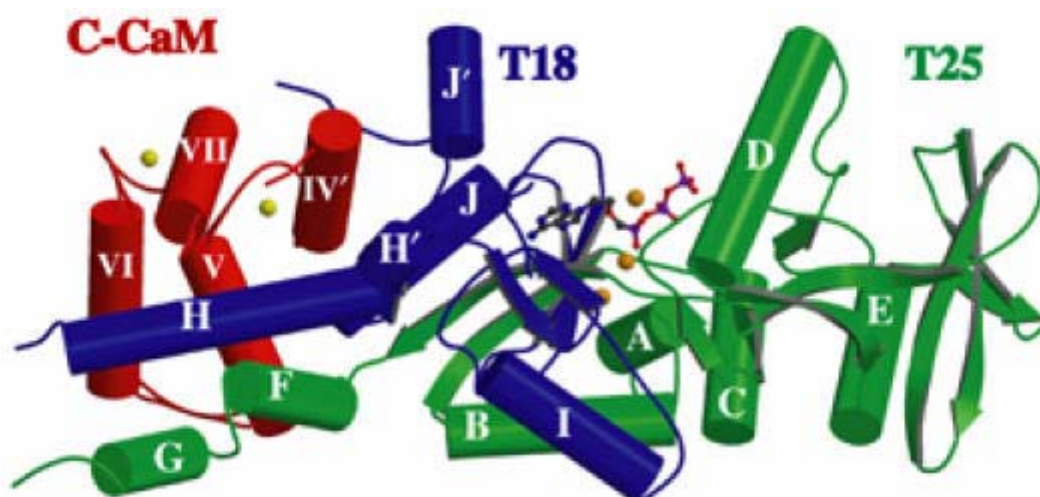
Adenylátcyklázový toxin je protein vykazující několik aktivit. Skládá se ze 1 706 aminokyselinových zbytků o celkové molekulové váze 177 kDa. Tento toxin je tvořen N-koncovou katalytickou adenylátcyklázovou (AC) doménou složenou z přibližně 400 aminokyselinových zbytků a z C-koncové části (složené z přibližně 1 300 aminokyselinových zbytků), která obsahuje RTX motiv (z anglického „repeat in-toxin“) a je zodpovědná za tvorbu pórů v cílových buňkách. Součinnost obou těchto částí CyaA je nezbytná pro kolonizaci dýchacího epitelu bakterií *Bordetella pertussis* v myším experimentálním modelu (Khelef *et al.*, 1992). Schéma struktury molekuly CyaA je znázorněno na obr. 5.



Obr. 5: Struktura adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis*. Převzato a upraveno z Ladant a Ullmann (1999).

AC doména sestává ze dvou funkčních částí – T25 a T18. Část T25 (aminokyselinové zbytky 1 – 224) obsahuje katalytické místo, zatímco část T18 (aminokyselinové zbytky 225 - 399) obsahuje hlavní vazebné místo pro kalmodulin (Ladant *et al.*, 1989). Z krystalové struktury (PDB kód: 1YRU) AC domény CyaA (v komplexu s C-koncovou částí kalmodulinu) jsou patrné čtyři oddělené úseky zodpovědné za vazbu kalmodulinu (Guo *et al.*, 2005). Sekundární struktura AC domény CyaA v komplexu s kalmodulinem je znázorněna na obr. 6. V molekule CyaA se zdá být nezbytný tryptofan v pozici 242 pro správnou vazbu kalmodulinu. Váže se do hydrofobní kapsy, která vzniká v molekule kalmodulinu po vazbě Ca^{2+} . Vazba kalmodulinu k CyaA v poměru 1:1 (Ladant, 1988) zvyšuje enzymatickou aktivitu CyaA více než 1000krát. Po této aktivaci dosahuje CyaA extrémně vysoké katalytické aktivity – $k_{\text{cat}} \sim 2000 \text{ s}^{-1}$ (Ladant a Ullmann, 1999).

RTX část adenylátcyklázového toxinu je funkčně nezávislá (Sakamoto *et al.*, 1992) a zodpovídá za hemolytickou aktivitu CyaA. V membráně tvoří CyaA malé, kation-selektivní póry o průměru mezi 0,6 a 0,8 nm, které způsobují koloidně-osmotickou lyzi erytrocytů (Benz *et al.*, 1994). Doména zodpovědná za tvorbu těchto pórů, se nachází mezi aminokyselinovými zbytky 500 a 800.



Obr. 6: Sekundární struktura AC domény adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* v komplexu s C-koncem kalmodulinu a v přítomnosti adenosin difosfátu. Části AC domény T18 a T25 jsou vyznačeny fialově a zeleně. C-koncový úsek kalmodulinu je vyznačen červeně. Žlutě jsou vyznačeny ionty Ca^{2+} ; oranžově jsou vyznačeny ionty Mg^{2+} . Atomy uhlíku, kyslíku, dusíku a fosforu v molekule adenosin difosfátu jsou vyznačeny šedě, červeně, modře a fialově. Převzato z Guo *et al.* (2005).

RTX část také obsahuje takzvanou acylovanou doménu (tvořenou aminokyselinovými zbytky 800 – 1 000). V této doméně dochází k posttranslačnímu připojení zbytků kyseliny palmitové na ϵ -amino skupiny lysinů v pozicích 860 a 983 (Hackett *et al.*, 1995; Hackett *et al.*, 1994). Připojení kyseliny palmitové je katalyzováno proteinem CyaC (Barry *et al.*, 1991).

V RTX části se také nachází segment (aminokyselinové zbytky 1166 – 1281) nezbytný pro vazbu CyaA na jeho receptor. Tím je integrin CD11b/CD18 (Guermónprez *et al.*, 2001), který je exprimován fagocytickými buňkami (neutrofily, dendritickými buňkami a makrofágy/monocyty), žírnými buňkami a NK buňkami. Díky tomu jsou fagocytické buňky primárním cílem pro CyaA. CyaA je s nižší efektivitou také schopen vázat se na buňky neexprimující integrin CD11b/CD18 (který je také označován jako CR3 nebo $\alpha_M\beta_2$). Posttranslační modifikace na lysinových zbytcích je nezbytná pro vazbu CyaA na CD11b/CD18 a pro přenos AC domény do cytozolu hostitelské buňky (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Bylo ukázáno, že CyaA, i když je acylovaný pouze na lysinovém zbytku 860, je stále schopen vazby na buňky myši linie J774A.1 (Masin *et al.*, 2005). Oproti tomu palmitoylace v pozici Lys 983 je nezbytnou a zároveň dostačující podmínkou pro dosažení aktivity CyaA na buněčných typech neexprimujících receptor CD11b/CD18 (Basar *et al.*, 2001). Takováto vazba CyaA

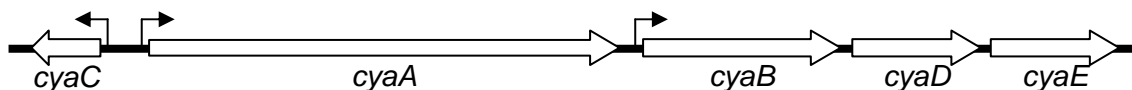
na buňky postrádající receptor CD11b/CD18 stále vede k internalizaci AC domény a ke zvýšení hladiny cAMP v cytozolu intoxikované buňky. Toto ukazuje množství prací v *in vitro* podmínkách (Ohnishi *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 1989).

Aktivita CyaA výrazně závisí na koncentraci volných Ca^{2+} iontů, jejichž vazba je nezbytná pro přechod toxinu do „aktivní“ konformace. Vazba Ca^{2+} iontů umožňuje molekule CyaA vazbu a průnik plasmatickou membránou cílové buňky, stejně jako tvorbu kation-selektivních pórů (Rogel a Hanski, 1992; Hewlett *et al.*, 1991; Hanski a Farfel, 1985). Místa vázající Ca^{2+} ionty jsou lokalizované uvnitř RTX části. Toxin obsahuje vysoký počet (asi 42) nízkoafinitních vazebných míst pro vápník lokalizovaných mezi posledními 700 C-koncovými aminokyselinovými zbytky CyaA a navíc menší počet (asi 5) vysokoafinitních vazebných míst pro vápník, jejichž umístění dosud nebylo určeno (Rose *et al.*, 1995). Předpokládá se, že vazebná místa pro vápník se nachází uvnitř repetice anti-paralelních β -listů tvořených sekvencí X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D, kde X může být jakákoliv aminokyselina (Rhodes *et al.*, 2001).

Posledních 74 C-koncových aminokyselinových zbytků molekuly CyaA slouží jako sekreční signál pro sekreční systém typu I (Sebo a Ladant, 1993).

3.1.1.2.2 Biogeneze CyaA

Exprese adenylátcyklázového toxinu z lokusu *cya* je pod kontrolou dvousložkového systému Bvg (viz kapitulu 3.1.1.1). Lokus *cya* je tvořen pěti geny – geny *cyaABDE* jsou seskupeny do jednoho operonu, zatímco gen *cyaC* je transkribován v opačném směru. Prvním genem v operonu *cyaABDE* je strukturní gen pro neaktivní formu adenylátcyklázového toxinu proCyaA. Tento je následován geny kódujícími tři komponenty sekrečního systému typu I (T1SS), které jsou homologní k sekrečnímu systému typu I známému z bakterie *E. coli*. T1SS kódovaný geny *cyaBDE* rozpoznává nesložený proCyaA polypeptid pomocí 74 aminokyselinových zbytků dlouhé sekreční sekvence na C-konci molekuly CyaA. Gen *cyaC* kóduje 22 kDa velkou acetyltransferázu CyaC, která je zodpovědná za posttranslační palmitoylaci proCyaA, což vede k aktivaci CyaA – přeměna proCyaA na maturovaný toxin CyaA (Barry *et al.*, 1991). Schéma lokusu *cya* je znázorněno na obr. 7.

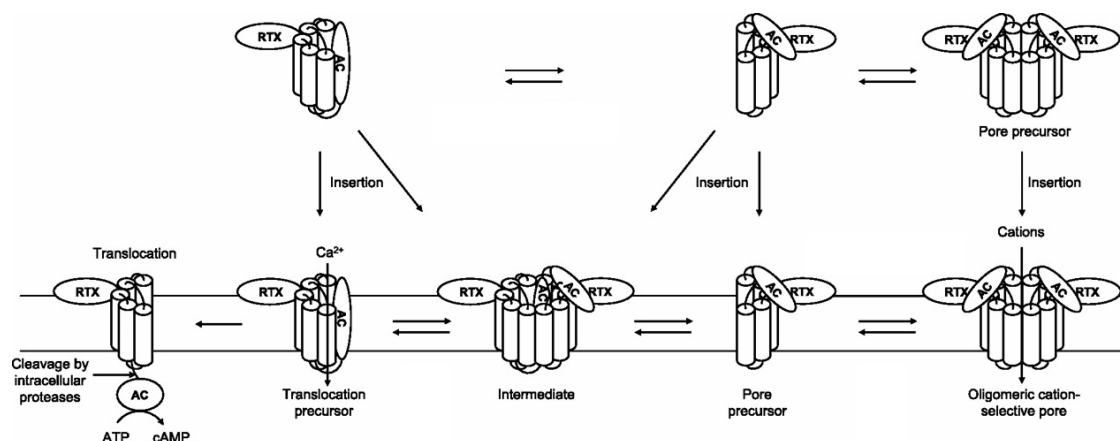


Obr. 7. Schématické znázornění *cya* lokusu. Gen pro acetyltransferázu CyaC se nachází před strukturním genem pro proCyaA a jeho transkribce probíhá v opačném směru. Transkribce genu *cyaA* je závislá na řízení pomocí dvousložkového systému Bvg. Transkribce genů *cyaBDE* probíhá nezávisle na virulenci bakterie z vlastního promotoru. Může ovšem také docházet k transkripci všech genů operonu *cyaABDE* z jednoho promotoru. Upraveno podle Laoide a Ullmann (1990).

3.1.1.2.3 Interakce CyaA s cílovými buňkami

Po kolonizaci dýchacích cest hostitele zůstává *Bordetella pertussis* stále extracelulární a dochází k její adhezi na řasinkové buňky dýchacího epitelu. Dochází k sekreci CyaA, který může interagovat s filamentózním hemaglutininem na povrchu bakterie, kde zůstává asociovaný (Zaretzky *et al.*, 2002). CyaA asociovaný prostřednictvím FHA k povrchu bakterie přispívá k její schopnosti udržet se na dýchacím epitelu. Na rozdíl od CyaA asociovaného s povrchem bakterie je nově sekretovaný CyaA schopen intoxikovat cílové buňky (Gray *et al.*, 2004). Aktivní molekuly toxinu primárně intoxikují hostitelské buňky exprimující receptor CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, komplementový receptor 3, Mac-1) – to znamená monocyty/makrofágy, neutrofil, dendritické buňky, žírné buňky a NK buňky (Guermonprez *et al.*, 2001). Nezbytná pro první interakci s receptorem CD11b/CD18 se jeví být N-glykosylace tohoto integrinu (Morova *et al.*, 2008).

Poté, co se CyaA naváže na receptor CD11b/CD18, dochází k inzerci molekuly toxinu do plazmatické membrány cílové buňky. Tato inzerce může proběhnout dvěma možnými způsoby (Osickova *et al.*, 1999): (a) s následnou translokací AC domény do cytozolu cílové buňky, nebo (b) může být doprovázena tvorbou kation-selektivních pórů v plazmatické membráně poté, co dojde k oligomerizaci (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). Pomocí místně specifické mutagenese v předpokládaném membránovém úseku molekuly CyaA bylo ukázáno, že tyto děje se víceméně vylučují a probíhají paralelně (Basler *et al.*, 2007; Osickova *et al.*, 1999) (obr. 8).



Obr. 8: Schématické znázornění interakce CyaA s membránou cílové buňky. Mezi prekuzory pro dopravu AC domény do cytozolu buňky a pro tvorbu pórů je ustanovena rovnováha. V membráně buňky dochází u některých molekul CyaA k translokaci AC domény do buněčného cytozolu. Tyto molekuly se již nemohou zúčastnit tvorby oligomeru tvořícího pór. Byla ale také popsána schopnost CyaA tvořit v membráně cílové buňky oligomery (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009).

CyaA způsobuje zvýšení hladiny vnitrobuněčného vápníku. K tomuto procesu přispívá translokace AC domény do cytozolu. Zároveň ale není tento proces závislý na permeabilizaci plasmatické membrány kation-selektivními póry nebo na tvorbě cAMP v cytozolu cílové buňky (Fiser *et al.*, 2007). Zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytozolu vede k přesunu komplexu CyaA-CD11b/CD18 do lipidových raftů. Tento proces závisí na aktivaci calpainu a sestřihu talinu (Bumba *et al.*, v tisku).

AC doména váže po svém průniku do cytozolu cílové buňky kalmodulin, což vede k nárůstu její katalytické aktivity a k tvorbě suprafyziologické koncentrace cAMP přeměnou ATP.

Zvýšení hladiny cytozolického cAMP působením CyaA vede k porušení schopnosti fagocytických buněk zabít jimi pohlcené bakterie *S. aureus* (Confer a Eaton, 1982). Bylo také ukázáno, že zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP prostřednictvím CyaA vede ke snížení chemotaxe a oxidačního vzplanutí fagocytických buněk (Friedman *et al.*, 1987), k inhibici FcR zprostředkované fagocytózy u neutrofilů (Weingart a Weiss, 2000) a k inhibici jak FcR tak CR3 zprostředkované fagocytózy u myších makrofágů (Kamanova *et al.*, 2008). Zvýšení hladiny cytozolického cAMP po působení CyaA může vést k indukci apoptózy u myších makrofágů (Khelef *et al.*, 1993). U lidských monocytů je za navození apoptózy zodpovědné porušení membránového potenciálu mitochondrií po působení CyaA a zvýšení hladiny cAMP v cytozolu (Bachelet *et al.*, 2002). K navození apoptózy po působení CyaA také může

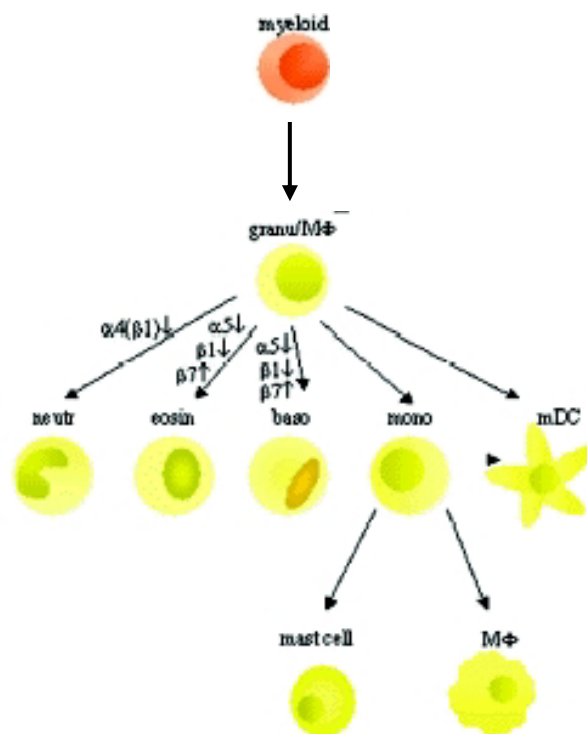
příspěvat snížení exprese HSP70 (z angl. „heat shock protein 70“) způsobené aktivitou CyaA (Bachelet *et al.*, 2002; Njamkepo *et al.*, 2000).

Bylo také ukázáno, že CyaA má imunomodulační účinky na dendritické buňky a na makrofágy. Po působení CyaA dochází k zvýšení produkce IL-6 a IL-10 vyvolanému signalizací přes TLR (z angl. „toll like receptor“). Oproti tomu ale u dendritických buněk a makrofágů dochází ke snížení produkce TNF- α , IL-12 a CCL3 (MIP-1 α) (Boyd *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2004). Dále je známo, že působení CyaA na „nezralé“ dendritické buňky vede ke zvýšené expresi aktivační molekuly CD80, ale zároveň k poklesu exprese CD54 (ICAM-1) a CD40 u těchto buněk (Ross *et al.*, 2004).

3.2 Makrofágy

První fagocytické buňky byly popsány už v druhé polovině 19. století Ilyou Mechnikovem u hvězdic. Makrofágy jsou obdobou těchto buněk u obratlovců a byly nejprve rozeznávány podle své velikosti a schopnosti pohlcovat některé částice – byly schopny fagocytózy. U obratlovců však makrofágy zastupují jen jeden ze čtyř typů fagocytických buněk, k dalším typům patří dendritické buňky, neutrofily a žírné buňky.

Makrofágy jsou buňky původem odvozené od myeloidní linie, stejně jako myeloidní dendritické buňky, žírné buňky a granulocyty. Vývoj makrofágů začíná v kostní dřeni – z kmenové buňky zde vzniká společný prekurzor granulocytů a monocytů/makrofágů (GM-CFU, z anglického “colony forming unit granulocyte-macrophage”). GM-CFU jsou vývojovým předstupněm monoblastů, ze kterých jsou odvozeny promonocyty a následně monocyty. Z monocytů pak pod vlivem tkáňově specifického prostředí vznikají makrofágy. Vývoj myeloidní linie od společného prekurzor granulocytů a makrofágů je znázorněn na obr. 9.



Obr. 9: Schéma vývoje myeloidní linie. Vývoj makrofágů začíná ze společného prekursoru pro všechny buňky myeloidní linie již v kostní dřeni. Makrofágy jsou na obrázku vyznačeny jako Mφ. Červeně znázorněná buňka představuje společný prekursor zobrazené myeloidní linie, je zobrazen také prekursor pro granulocyty (granu) a makrofágy. Neutrofily jsou zobrazeny jako neutr., eosinofily jako eosin., basofily jako baso. a myeloidní dendritické buňky jako mDC. V obrázku jsou vyznačeny faktory, jejichž přítomnost směřuje vývoj k danému typu buněk.

Převzato z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A44563#A44564>

Makrofágy patří mezi buňky, které v organismu přetrvávají měsíce až roky, můžeme je tedy označit za dlouhožijící. I po konečné maturaci vykazují jistou míru proliferace, což přispívá k udržení hladiny tkáňově specifických makrofágů.

Makrofágy zastávají v imunitních procesech hostitele dvě klíčové úlohy. Společně s neutrofily jsou vybaveny k nespecifické likvidaci cizorodých částic a jsou tedy nezbytné pro kontrolu bakteriálních infekcí. Tato funkce je staví do první linie, co se týče imunitní obrany organismu. Zároveň jsou makrofágy důležité pro aktivaci adaptivní imunity organismu, neboť jsou schopny účinně prezentovat jimi pohlčené antigeny, podobně jako dendritické buňky (Pozzi *et al.*, 2005).

Po konečné maturaci v cílové tkáni dochází k “přípravě” (priming) makrofágů. Nejdůležitějším stimulantem v tomto procesu je $\text{INF-}\gamma$ (Sweet *et al.*, 1998), který je uvolňován v koncentraci nezpůsobující plnou aktivaci makrofágů. Během tohoto procesu dochází k nárůstu vnímavosti makrofágů k následným stimulům (Ma *et al.*,

2003). Nedochází však k produkci prozánětlivých cytokinů ani k produkci reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů.

K aktivaci makrofágů může dojít mnoha různými způsoby. Příkladem může být přítomnost částí bakterií (např. lipopolysacharid gram-negativních bakterií jako jsou *E. coli* nebo *B. pertussis*). Takovéto aktivační stimuly jsou detekovány mnohými receptory, typickým příkladem je TLR rodina receptorů. Dalším signálem pro aktivaci makrofágů je přítomnost různých produktů jiných buněk organismu. Bylo prokázáno, že způsob imunologické reakce makrofágů je závislý na způsobu jejich aktivace – na složení prostředí, ve kterém k aktivaci došlo (Fairweather a Cihakova, 2009; Ma *et al.*, 2003). Podle způsobu aktivace můžeme makrofágy rozdělit do dvou skupin.

Makrofágy aktivované v přítomnosti relativně vysoké koncentrace INF- γ jsou nazývány jako “klasicky” aktivované nebo jako M1 makrofágy. Tyto buňky jsou charakteristické expresí inducibilní NO syntázy (iNOS) a vylučují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , INF- α/β , IL-12, IL-18) a chemokiny (CCL15, CCL20, CXCL8-11 a 13).

V odpovědi na převažující IL-4 jsou makrofágy aktivované “alternativně” a bývají také označovány jako M2 makrofágy. M2 makrofágy exprimují arginázu (spíše než iNOS) (Hesse *et al.*, 2001), vychytávací receptory („scavenger“ receptory), lektiny typu C a vylučují fibronektin, matrixové metaloproteázy a TGF- β . M2 makrofágy jsou nezbytné pro správné léčení mechanických poranění.

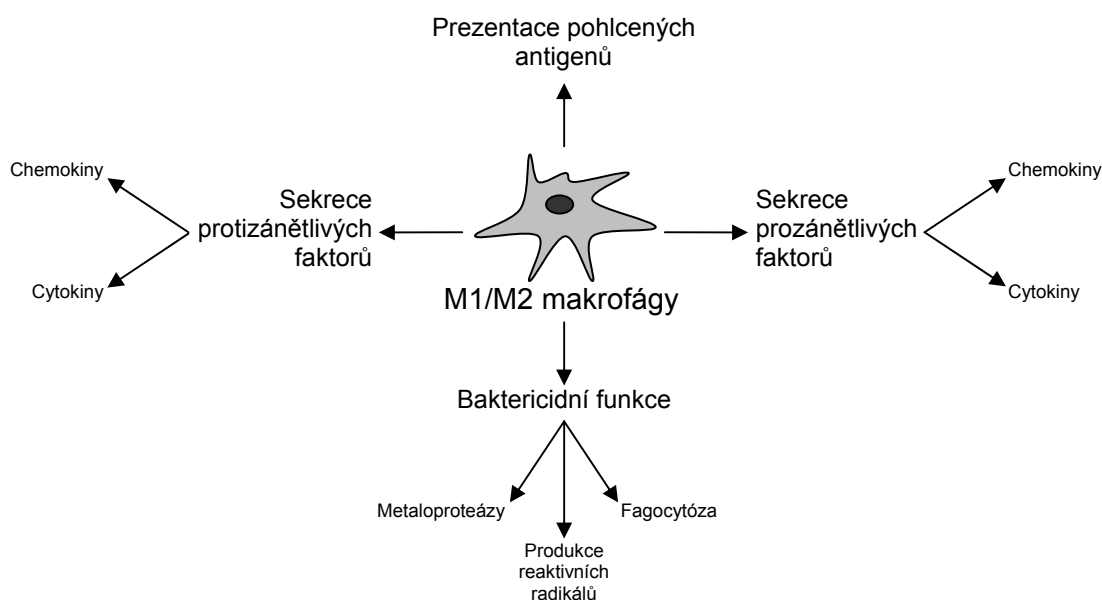
Aktivované makrofágy vykazují velké množství důležitých funkcí, jenž napomáhají odstranění patogenního organismu z infikované tkáně. Mezi tyto funkce řadíme komplementovým receptorem a Fc-receptorem zprostředkovanou fagocytózu a produkci reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů (která je typická pro M1 makrofágy). V případě, že je patogenní stimulus obtížné zničit, mohou makrofágy diferencovat do epiteloidní buňky a vytvořit granula, která obalí a izolují potenciálně nebezpečné stimuly (Magez *et al.*, 1998).

Mezi další důležité úlohy, které makrofágy zastávají v organismu, patří produkce cytokinů, jejichž působení vede k prodloužení života jiných druhů imunitních buněk (jako například neutrofilů) (Brach *et al.*, 1992). Makrofágy také produkují prozánětlivé cytokiny a chemokiny a jsou schopné makropinocytózy, která je úzce spojena s následnou prezentací pohlcených antigenů T lymfocytům.

Po odstranění patogenního stimulu dochází k deaktivaci makrofágů nebo k jejich smrti, aby nedocházelo k poškození okolní tkáně. Deaktivace je řízený proces, který následně umožňuje opětovnou aktivaci makrofágů jak na M1 tak na M2 makrofágy

(Hume, 2008). Deaktivace makrofágů může být dosaženo zvýšením koncentrace protizánětlivých cytokinů, jako jsou IL-10 a protizánětlivých prostaglandinů (prostaglandin A1). Během deaktivace vyvolané těmito látkami dochází k inhibici signalizace přes NFκB, AP-1 a STAT. Další možností deaktivace makrofágů je zvýšení hladiny vnitrobuněčného 3'5'-cyklického adenosin monofosfátu, což opět vede k deaktivaci AP-1, NFκB a navíc i IRF1 (z angl. „interferon regulatory factor 1“). I přímá interakce mezi dvěma buňkami může vést k deaktivaci makrofágů. Dochází pak k fosforylaci receptoru obsahujícího ITIM (z angl. „immune receptor tyrosine-based inhibitory“) motiv, na který se následně váží tyrozinové fosfatázy obsahující SH2 doménu (z angl. „Src homology 2“), které defosforylují a tím inhibují další signální procesy.

V literatuře jsou kromě M1 a M2 makrofágů popsány ještě další dva typy makrofágů. Supresorové buňky odvozené z myeloidní linie a makrofágy asociované s nádorem jsou označovány jako jen částečně maturované makrofágy. Je o nich známo, že regulují imunitní odpověď k nádorům a parazitům (Mordue a Sibley, 2003). Oba tyto buněčné typy exprimují podobné receptory a produkují cytokiny specifické pro M1 i M2 makrofágy.



Obr. 10: Schématické znázornění procesů prováděných makrofágy. Makrofágy se podílejí na řadě procesů vedoucích jak k aktivaci tak k inhibici imunitních procesů. Mezi tyto procesy lze počítat přímé odstranění patogenních organismů pomocí produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů a fagocytózy, stejně jako reorganizace okolní tkáně pomocí sekretovaných metaloproteáz. K obraně organismu přispívá i prezentace pohlcených antigenů T lymfocytům, stejně jako produkce pro- (IL-1,8) a protizánětlivých (IL-10, TGF-β) cytokinů a chemokinů.

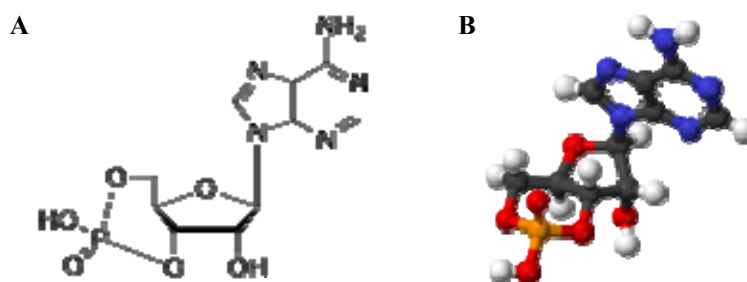
3.2.1 Signalizace cAMP v makrofázích

Objevení cyklického nukleotidu 3'5'-cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) (obr. 11), před zhruba padesáti lety, předznamenalo počátek zkoumání nových signalizačních drah, ve kterých je tento druhý posel velmi výrazně zastoupen. Hladina cAMP je uvnitř buňky pod přísnou kontrolou buněčných adenylátcykláz a fosfodiesteráz. Zatímco buněčné adenylátcyklázy jsou po své aktivaci zodpovědné za tvorbu cAMP z ATP (adenosin trifosfátu), buněčné fosfodiesterázy cAMP naopak štěpí na 5'-AMP (adenosin monofosfát) a tím se podílejí na regulaci celkové hladiny cAMP.

V buňkách savců bylo dosud objeveno deset tříd adenylátcykláz. Buněčné adenylátcyklázy obsahují dvanáct transmembránových úseků, které je kotví do plazmatické membrány. Katalytické místo je tvořeno z úseků, které se nacházejí mezi transmembránovým úsekem 6 a 7 (C1 úsek) a po transmembránovém úseku 12 (C2 úsek). Adenylátcyklázy jsou stimulovány respektive inhibovány pomocí trimerních G proteinů (G_s respektive G_i). Aktivita G proteinů je řízena vazbou signálních molekul na membránové receptory, které byly charakterizovány i v makrofázích podobně jako v ostatních buněčných typech (Abrass *et al.*, 1985). Působení trimerních G proteinů na produkci cAMP využívají i některé bakteriální toxiny, jako jsou například cholery toxin stimulující G_s (Van Dop *et al.*, 1984) nebo pertusový toxin (PTX), který naopak inhibuje G_i (Van Dop *et al.*, 1984). Výjimkou v popsání regulaci aktivity buněčných adenylátcykláz je solubilní adenylátcykláza, která jako jediná není kotvena k plazmatické membráně a nemůže tedy být regulována trimerními G proteiny. Slouží spíše jako senzor změny pH. Byla také zaznamenána změna aktivity buněčných adenylátcykláz v průběhu diferenciaci monocytů na makrofágy, oproti tomu nebyla zaznamenána změna aktivity guanylatcykláz (O'Dorisio *et al.*, 1984).

Fosfodiesterázy štěpící cyklické nukleotidy jsou u savců děleny do jedenácti rodin. Rodiny PDE (phosphodiesterase) 1, 2, 3, 10 a 11 váží jednak cAMP, ale také cGMP. Rodiny PDE 4, 7 a 8 štěpí cAMP a rodiny PDE 5, 6 a 9 štěpí cGMP. Buněčná lokalizace fosfodiesteráz je řízena pomocí jejich vazby s jinými proteiny do proteinových komplexů. Pozorování hladiny exprese PDE u klidových makrofágů nevedlo k zjištění významných změn oproti expresi PDE v jiných buněčných typech (Zendegui a Klein, 1982). Zároveň bylo pozorováno snížení aktivity PDE u makrofágů vystavených působení LPS (Zendegui a Klein, 1982).

Hlavní složku proteinových komplexů zastoupených v prostorové a časové regulaci signalizace cAMP tvoří často proteiny AKAP (z angl. „A kinase anchor proteins“). U savců bylo zatím identifikováno přes padesát různých druhů těchto proteinů, které nemají konzervovanou aminokyselinovou sekvenci ani strukturu. AKAP proteiny jsou schopné tvořit různorodé proteinové komplexy, které často obsahují proteinovou kinázu A, cAMP štěpící fosfodiesterázu a protein Epac (Jarnaess a Tasken, 2007).



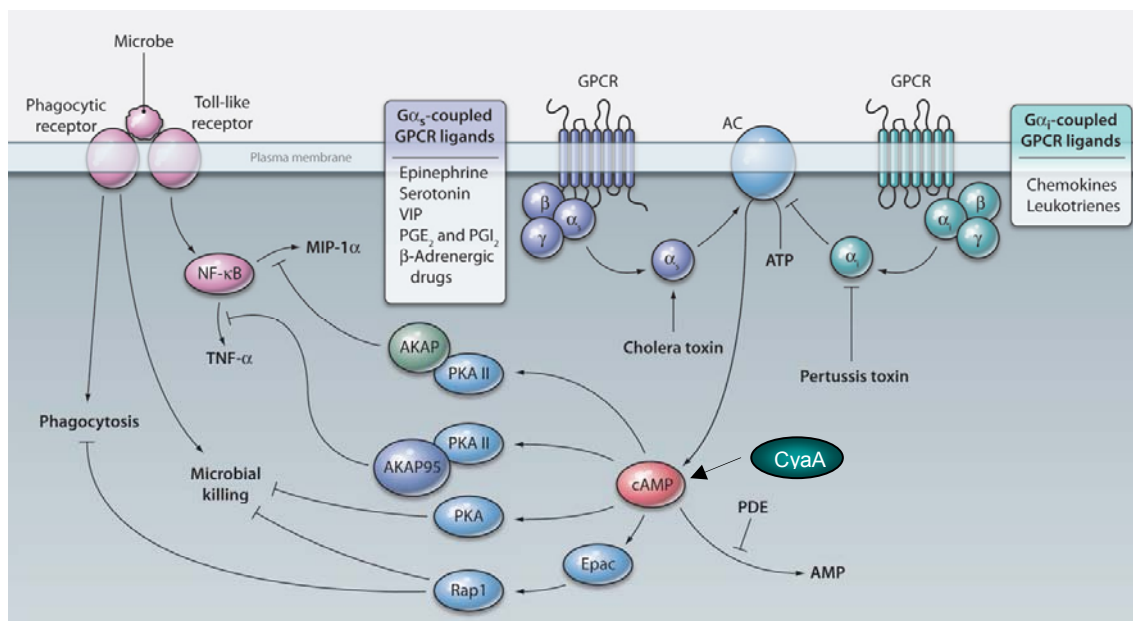
Obr. 11: Molekula cAMP (3',5'-cyklického adenosin monofosfátu).

- a) strukturní vzorec
- b) kuličkový model

Převzato z www.wikipedia.com

cAMP-regulované signalizační kaskády hrají významnou úlohu v širokém spektru buněčných pochodů, od metabolických dějů přes genovou expresi a endocytózu až k buněčnému dělení. Těchto a dalších efektů je v buňce dosaženo pomocí různých cAMP-aktivovaných efektorů, mezi které bývají u makrofágů zahrnovány především proteinová kináza A a protein Epac. Mezi zaznamenané procesy ovlivňované u makrofágů změnou hladiny cAMP patří například inhibice produkce TNF- α (Jarnaess a Tasken, 2007), inhibice fagocytózy (Confer a Eaton, 1982) nebo ovlivnění produkce oxidu dusnatého (Galea a Feinstein, 1999). Účinky zvýšení hladiny cAMP zprostředkované pomocí PKA nebo proteinu Epac mohou být v jedné buňce velmi podobné, zástupné, nebo naopak protichůdné.

Schéma působení cAMP v makrofázích je znázorněno na obr. 12.



Obr. 12: Regulace signalizace v makrofázích pomocí cAMP. Zvýšení hladiny cAMP v makrofázích vede k inhibici fagocytózy a baktericidních mechanismů makrofágů, které aktivuje přítomnost mikroorganismů, podobně jako je tomu u produkce prozánětlivých faktorů. Některé bakteriální toxiny mohou ovlivňovat hladinu cAMP v cytozolu makrofágů. Převzato a upraveno z Peters-Golden (2009)

3.2.1.1 Proteinová kináza A

Proteinová kináza A (PKA, také proteinová kináza řízená cAMP) je jednou z prvních objevených kináz v historii. Ačkoliv patří mezi kinázy rodiny AGC, narozdíl od většiny zástupců této rodiny je složena z podjednotek, které nejsou kovalentně propjeny – regulační podjednotka váže dvě molekuly cAMP, a to vede k uvolnění katalytické podjednotky. Katalytická podjednotka je fosforylována v hydrofobním motivu kinázou PDK1, což vede k její plné aktivitě a schopnosti reagovat na zvýšení hladiny cAMP v cytozolu buňky (Cheng *et al.*, 1998). Fosforylovaný hydrofobní motiv PKA již není přístupný pro fosfatázy a nemůže tedy dojít k inaktivaci PKA defosforylací. Katalytická podjednotka PKA je tedy dále řízena pouze interakcí s regulační podjednotkou (Taylor *et al.*, 2005). Katalytické a regulační podjednotky se v buňce nacházejí v podobě heterotetrameru až do vazby cAMP na regulační podjednotky, pak dochází k disociaci katalytických podjednotek, které následně fosforylací ovlivňují aktivitu velkého množství buněčných proteinů v cytozolu i v jádře (Sastri *et al.*, 2005).

V savcích buňkách se vyskytují dvě formy PKA odlišitelné podle rozdílné regulační podjednotky (RI a RII), které reagují s pouze jediným typem katalytické

podjednotkou. Oproti tomu se v savčím genomu nachází čtyři geny pro regulační podjednotky PKA: RI α , RI β , RII α a RII β a tři geny pro katalytické podjednotky Ca, C β a C γ . Doposud nebyly objeveny žádné preference pro interakci regulačních podjednotek s určitou formou katalytické podjednotky.

Role PKA je známá v celé řadě buněčných dějů od diferenciace přes metabolismus a genovou expresi až po imunologicky významné děje. Tyto procesy jsou zprostředkovány fosforylací velkého množství buněčných proteinů po aktivaci PKA. Mezi efektory PKA řadíme například transkripční faktor CREB, který je fosforylován po translokaci katalytické podjednotky PKA do jádra (Sastri *et al.*, 2005), nebo malý G protein RhoA (Lang *et al.*, 1996), jehož fosforylace vede ke snížení jeho aktivity. PKA je také schopna fosforylovat a tím regulovat fosfatázy PP1 a PP2A nebo kinázu GSK3 β , která je významným regulátorem buněčného metabolismu.

Krystalová struktura proteinové kinázy A je znázorněna na obr. 13.



Obr. 13: Krystalová struktura PKA (PDB kód: 3IDC). Obrázek znázorňuje krystalovou strukturu regulační RII β podjednotky v komplexu s katalytickou podjednotkou a nehydrolyzovatelným analogem ATP. Krystalizovaná RII β podjednotka obsahuje aminokyselinové zbytky 102 až 265, což zahrnuje pouze jedno cAMP vazebné místo. Převzato z Brown *et al.* (2009)

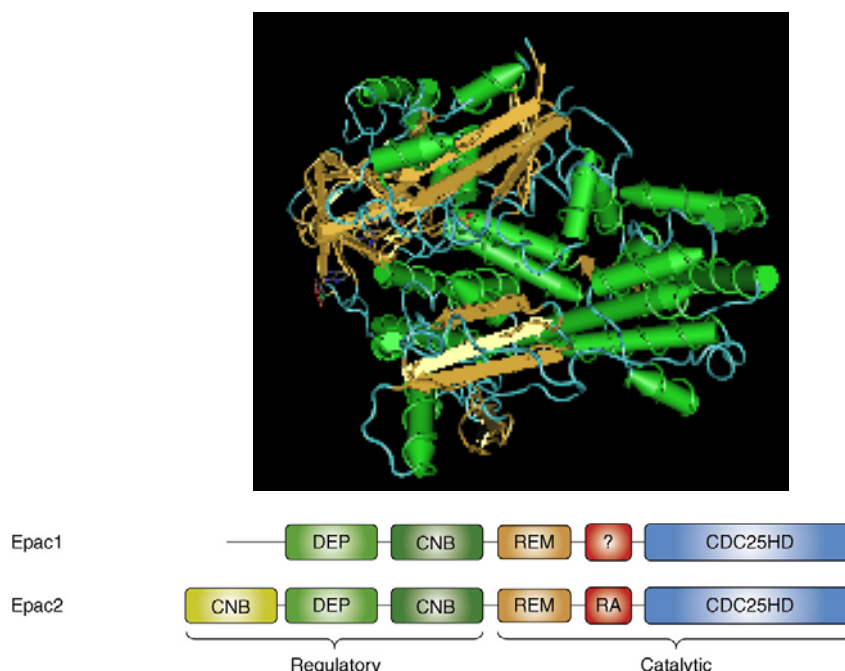
3.2.1.2 Protein Epac

V savčích buňkách se nachází dvě varianty proteinu Epac (z angl. „exchange protein activated by cAMP“) – Epac 1 a 2. Exprese těchto forem se zdá být tkáňově specifická a v makrofázích je exprimován pouze Epac1 (Aronoff *et al.*, 2005). Ve struktuře proteinu Epac nacházíme několik funkčně odlišných domén (Bos, 2006). N-koncová doména (CNB) je důležitá pro vazbu na membránu a obsahuje PH (z angl. „pleckstrin homology“) část (DEP doména). Druhá doména je zodpovědná za vazbu

cAMP. Vazebné místo pro cAMP je homologní k regulační podjednotce PKA a zároveň umožňuje vazbu na mikrotubuly. REM (z angl. „Ras Exchange motif“) doména spojuje cAMP vazebnou doménu a RA (z angl. „Ras associating“) doménu, která byla objevena u některých proteinů schopných vázat zástupce Ras rodiny malých G proteinů. C-koncová doména homologní s CDC25 vykazuje GEF aktivitu pro proteiny Ras rodiny.

Role proteinu Epac byla zaznamenána v celé řadě důležitých buněčných pochodů, jako jsou buněčná adheze zprostředkovaná integriny [efektor proteinu Epac, malý G protein Rap1 je znám jako důležitý faktor aktivace integrinu CD11b/CD18 (Caron *et al.*, 2000)], tvorba buněčných spojení („cell-cell junctions“), apoptóza nebo regulace Akt (Hong *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2008; Canetti *et al.*, 2007). U makrofágů ale byla prokázána i role signální dráhy Epac/Rap1, která ovlivňuje funkce transkripčního faktoru CREB (Misra a Pizzo, 2005). U proteinu Rap1 bylo v jeho C-koncové doméně objeveno místo pro fosforylaci PKA, tato fosforylace ale nehraje roli v aktivaci Rap1 pomocí proteinu Epac (de Rooij *et al.*, 1998), ale zdá se, že hraje roli v interakci s dalšími partnery proteinu Rap1 (Hu *et al.*, 1999).

Krystalová struktura proteinu Epac je znázorněna na obr. 14.



Obr. 14: (A) Krystalická struktura proteinu Epac (PDB kód: 3CF6). Obrázek znázorňuje krystalickou strukturu proteinu Epac2 v komplexu s cAMP a proteinem Rap1B. Převzato z Rehmann *et al.* (2008). Krystalická struktura proteinu Epac1, který se na rozdíl od proteinu Epac2 exprimuje v makrofázích, dosud není známa. (B) Schématické znázornění řazení primární struktury molekul Epac1 a Epac2. CNB doména je zodpovědná za vazbu cAMP, DEP doména obsahuje část homologii k PH doméně, obrázek také znázorňuje umístění REM domény a následně RA domény, která se váže na zástupce Ras rodiny. CDC25HD doména je zodpovědná za GEF aktivitu. Převzato a upraveno z Bos (2006)

3.2.2 Makropinocytóza

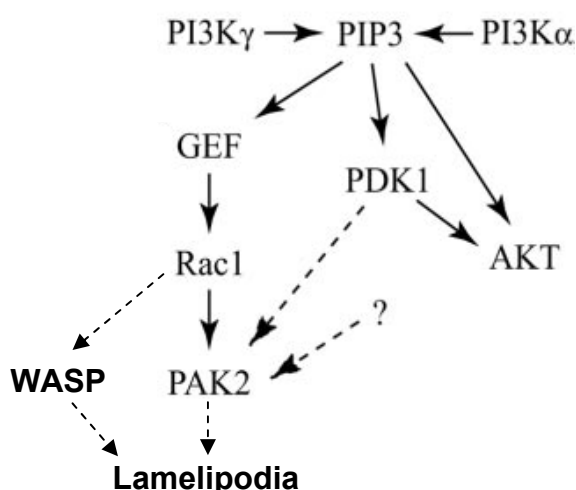
Makropinocytóza je důležitý buněčný proces, který lze pozorovat jak u jednobuněčných tak i u mnohobuněčných organismů. Od svého objevení v roce 1931 byla makropinocytóza studována mnoha různými přístupy a nyní je obecně definována jako způsob endocytózy, během které jsou nespecificky přijímána velká množství okolního roztoku.

Tento imunologicky významný proces je napadán celou řadou patogenních organismů, jako jsou viry (Mercer a Helenius, 2008) a bakterie (Garcia-Perez *et al.*, 2008). Patogeny se tímto snaží vstoupit do ideálního prostředí uvnitř hostitelské buňky (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994), nebo brání tomuto procesu jako takovému (Kamanova *et al.*, 2008).

Morfologicky je makropinocytóza doprovázena přestavbou plasmatické membrány, podobně jako ostatní endocytické procesy (např. klatrinem zprostředkovaná endocytóza nebo fagocytóza). Zároveň v této fázi dochází k polymerizaci aktinových vláken pod plasmatickou membránou, což je doprovázeno tvorbou lamelipodií – procesem známým z literatury jako „membrane ruffling”. Po uzavření lamelipodií jsou od membrány odškrabovány velké váčky (o průměru 0,2 – 0,5 μm), nazývané obecně makropinozomy, které obsahují nespecificky vybraný roztok původně obklopující buňku. Tento proces je nezávislý na aktivitě dyneinu (Swanson a Watts, 1995). Makropinozomy jsou v buňkách schopny prezentovat pohlcené antigeny směrovány do endo-lysozómů. V ostatních buněčných typech makropinozomy s endo-lysozomy nefúzíjí (Hewlett *et al.*, 1994). Z makropinozómů mohou také být odškrabeny váčky sloužící pro recyklaci některých membránových složek, podobně jako je tomu u endozómů. Tvorba a zrání makropinozómů je doprovázena změnami v jejich fosfolipidovém složení [shrnutí od Donaldson *et al.* (2009) a Kerr a Teasdale (2009)].

Již dříve bylo popsáno, že pro tvorbu lamelipodií a makropinozómů je důležitá aktivita PI3K (z angl. „phosphoinositide 3-kinase“), která tvoří v plasmatické membráně fosfatidylinositol(3,4,5)-trisfosfát (PIP3) (Araki *et al.*, 1996). Přítomnost PIP3 umožňuje vazbu proteinů obsahujících PH (z angl. „pleckstrin homology“) doménu, jako jsou na příklad PDK-1 (z angl. „phosphoinositide dependent kinase 1“) a Akt kináza (proteinová kináza B, PKB) (Rupper *et al.*, 2001). PIP3 jsou také důležité pro aktivaci různých GEF (z angl. „guanine nucleotide exchange factors“) proteinů pro malé G proteiny rodiny Rho (viz schéma na obr. 15). Poté, co jsou aktivovány,

mohou malé G proteiny rodiny Rho (především pak Rac1 a CDC42) způsobovat polymerizaci aktinu pomocí aktivace proteinu WASP a tak zapříčiňují tvorbu lamelipodií (Kurokawa *et al.*, 2004). Signální procesy, vedoucí k aktivaci těchto proteinů a stejně tak signalizace následující jejich aktivaci, jsou složité procesy, které jsou často závislé na buněčném typu, ve kterém jsou pozorovány. Některé z těchto proteinů mohou být v určitých buněčných typech antagonisty (např. Rac1 a RhoA). A zdá se, že právě makrofágy jsou jedním z takových buněčných typů (Kamanova *et al.*, 2008). Na buňkách linie THP1 (ta je odvozena od lidských monocytů) bylo ukázáno, že inhibice ROCK kinázy, která je efektem proteinu RhoA, vede k produkci lamelipodií (Worthylake a Burridge, 2003). V naší laboratoři bylo nedávno prokázáno, že působení adenylátcyklázového toxinu z bakterie *Bordetella pertussis* vede k inhibici RhoA a produkci lamelipodií v myších monocytech (Kamanova *et al.*, 2008). Je také známo, že proteiny CDC42 a Rac1 jsou schopné aktivovat kinázu PAK (z angl. „p21 activated kinase“). Tato aktivace může následně vést k aktivaci proteinu CtBP1/BARS (z angl. „C-terminal-binding protein-1/brefeldinA-ADP ribosylated substrate“). Nedávno bylo ukázáno, že aktivita proteinu CtBP1/BARS je nezbytná pro uzavření makropinozomu (Liberali *et al.*, 2008).



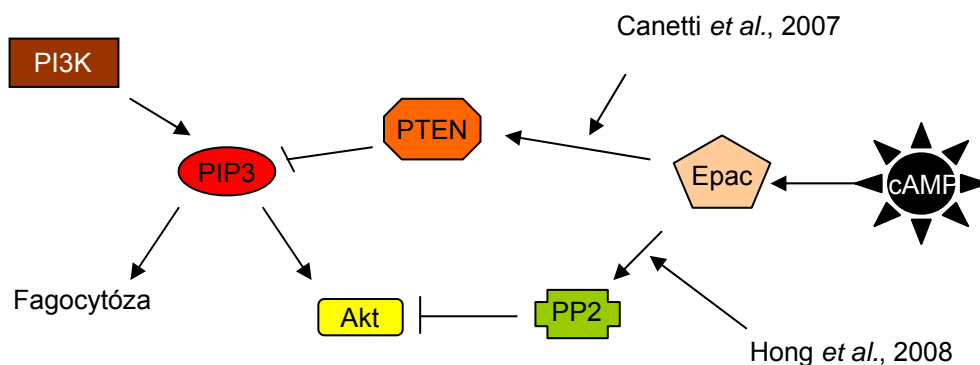
Obr. 15: Schématické znázornění signalizační dráhy zapojené ve změnách morfologie makrofágů po aktivaci PI3K. PI3K po své aktivaci tvoří v membráně PIP3. Vazba PH domény PDK1 a Akt kinázy na PIP3 vede k jejich kolokalizaci a fosforylaci Akt kinázy, která následně aktivuje mnoho dalších signálních molekul. Na PIP3 se také váží některé GEF proteiny pro malé G proteiny, což vede k aktivaci proteinu Rac1, který následně aktivuje PAK2 kinázu. Důsledkem je přestavba plazmatické membrány a tvorba lamelipodií. Převzato a upraveno podle Weiss-Haljit *et al.* (2004).

Po aktivaci proteinu Epac dochází v krysích alveolárních makrofázích k aktivaci duální fosfatázy PTEN (z angl. „phosphatase and tensin homolog on chromosome 10“), která je schopna rozkládat PIP3 v membráně. K aktivaci fosfatázy PTEN dochází po aktivaci malého G proteinu Rap1, který je znám jako jeden z efektorů proteinu Epac (de Rooij *et al.*, 1998), a následně aktivaci tyrozínové fosfatázy SHP-1. V krysích alveolárních makrofázích vede tato signální dráha k narušení Fc-receptorem zprostředkované fagocytózy (Canetti *et al.*, 2007).

Jak již bylo zmíněno výše, je pro správné fungování endocytických procesů zapotřebí reorganizace aktinového cytoskeletu. Bylo ukázáno, že k reorganizaci mikrofilament dochází také po aktivaci Akt kinázy. Toto bylo studováno i na imunologicky významných procesech, jako jsou fagocytóza (Shiratsuchi a Basson, 2007) a buněčná migrace (Qian *et al.*, 2004). V obou těchto procesech dochází k aktivaci Akt a následně pomocí signalizace přes mTOR komplex 1 i k stimulaci kinázy p70 S6K (Shiratsuchi a Basson, 2007; Ganesan *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2004).

Druhý způsob, jakým může být makropinocytóza ovlivněna zvýšením hladiny cytosolického cAMP, byl ukázán v roce 2008 (Hong *et al.*, 2008). V této práci byla sledována defosforylace Akt kinázy následující po aktivaci PP2A (z angl. „protein phosphatase 2A“). K této aktivaci PP2A došlo po stimulaci proteinu Epac, pravděpodobně s přispěním proteinu Rap1. Vliv PP2A na fosforylaci Akt kinázy byl popsán již dříve (Cazzolli *et al.*, 2001). Zároveň je ale také známé obdobné působení na Akt kinázu u dalších serin/threoninových fosfatáz, jako jsou na příklad PP1 (z angl. „protein phosphatase 1“) (Chen *et al.*, 2005) a PHLPP (z angl. „PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase“) (Gao *et al.*, 2005).

Schéma znázorňující popsaná působení cAMP je na obr. 16.



Obr. 16: Schéma ovlivnění hladiny PIP3 a Akt aktivity po zvýšení hladiny cAMP v cytosolu makrofágů. Podle Hong *et al.* (2008) a Canetti *et al.* (2007).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

Bürkerova komůrka, Marienfeld, SRN

Centrifuga Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN

Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA

Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen, SRN

CO₂ inkubátor IG 150, Jouan, Francie

Digitální analytické váhy, Mettler, SRN

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Fluorescenční průtokový cytometr LSR II, BD Biosciences, USA

Fluorometr Safire2, Taecan, Rakousko

Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko

Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, ČR

Laminární box MSC 12, Jouan, Francie

Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Jugoslávie

Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Francie

pH-metr MV 870, Prácitronick, SRN

Předvážky Nagema, OWA Labor, SRN

Přístroj pro detekci luminiscence LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System),
Fuji, Japonsko

Spektrofotometr S2100 Diode Array Spectrophotometer, Biowave, USA

Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie

Suchý termostatovaný blok, Vývojové dílny ČSAV, ČR

Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, SRN

Ultrasonikátor 4710, Cole-Parmer Instruments Co., USA

Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., USA

Zařízení pro DNA elektroforézu, Bio Rad, Inc. USA.

Zařízení pro polymerázovou řetězovou reakci PCRSprint, Thermo Hybaid, SRN

Zařízení pro Western blot Semiphor, Hoefer, USA

Zdroj napětí Bio-Rad Power-Pac 1000, Bio-Rad, ČR

Zdroj pro elektroforézu, Vývojové dílny ČSAV, ČR

Zdroj UV záření, Ultra Violet Products, Inc., USA

4.1.2 Chemikálie

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina (HEPES); Serva Electrophoresis, SRN

8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP (8-CPT-cAMP); Bio-Log, SRN

Agaróza; Lonza, Švýcarsko

Akrylamide; Merck, SRN

Ampicillin; Biotica, SR

Antibiotika, antimykotika (100x) stabilizované, 10 000 U/ml penicilin G, 10 mg/ml streptomycin a 25 µg/ml amphotericin B; Sigma-Aldrich, USA

Bakto-trypton; Oxoid, Velká Británie

Bromfenolová modř; Sigma-Aldrich, USA

Calyculin A, Cell Signaling Technology, USA

CompleteMini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, SRN

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), Sigma-Aldrich, USA

DEAE-sepharose; Sigma-Aldrich, USA

Deionizovaná voda (dH₂O), Přípravna médií ÚMG AV, ČR

Difosforečnan sodný (Na₄P₂O₇); Chemapol, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄); Sigma-Aldrich, USA

Dimethylsulfoxide (DMSO); Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsírán sodný (SDS); Serva Electrophoresis, SRN

DMEM médium, Přípravna médií ÚMG AV, ČR

Dusitan sodný (NaNO₂); Sigma-Aldrich, USA

Ethidium bromide; Sigma-Aldrich, USA

Ethylenediaminetetraoctová kyselina (EDTA); Serva Electrophoresis, SRN

Fetální hovězí sérum (FBS); Gibco, SRN

Fluorescein isothiocyanate-dextran, Sigma-Aldrich, USA

Fluorid sodný (NaF); Sigma-Aldrich, USA

FuGENE 6 Reagent; Roche, SRN

Glutamin 3% roztok, Přípravna médií ÚMG AV, ČR
 Glukóza 25% roztok, Přípravna médií ÚMG AV, ČR
 Glycerol; Lach:Ner, ČR
 Glycin; Serva Electrophoresis, SRN
 Hovězí sérový albumin (BSA); Roth, SRN
 Hydrogen uhličitán sodný (NaHCO_3) 7,5% roztok, Přípravna médií ÚMG AV, ČR
 Hydroxid sodný (NaOH); Lachema, ČR
 Chlorid amonný (NH_4Cl); Sigma-Aldrich, USA
 Chlorid draselný (KCl); Chemapol, ČR
 Chlorid hořečnatý (MgCl_2); Fluka, Švýcarsko
 Chlorid sodný (NaCl); Lach:Ner, ČR
 Chlorid vápenatý (CaCl_2); Lachema, ČR
 Chloroform; Lach:Ner, ČR
 Isopropanol; Lach:Ner, ČR
 Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid (IPTG); Enzo Life Sciences, USA
 Lambda DNA; Fermentas, Litva
 Lucifer yellow; Invitrogen, USA
 Kanamycin; Sigma-Aldrich, USA
 Kvasničný autolyzát; Oxoid, Velká Británie
 Kyselina chlorovodíková (HCl); Lach:Ner, ČR
 Kyselina octová; Lach:Ner, ČR
 Kyselina orthofosforečná; Lach:Ner, ČR
 Kyselina sírová (H_2SO_4); Lach:Ner, ČR
 Methanol; Lach:Ner, ČR
 Močovina; Serva Electrophoresis, SRN
 N-(2-Naphtyl)ethylenediamine; Sigma-Aldrich, USA
 N⁶, 2'- O- Dibutyryladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate 2-merkapt ethanol;
 Calbiochem, SRN
 N⁶-Benzoyl-cAMP (6-Bnz-cAMP); Bio-Log, SRN
 Nitrocelulózová membrane BioTrace NT; Pall Corporation, USA
 N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethan (TEMED); Merck, SRN
 Nonidet P-40 (NP-40); Fluka, Švýcarsko
 Octan draselný; Fluka, Švýcarsko

o-Phenylendiamine (OPD), Sigma-Aldrich, USA
Phenyl-sepharose; Sigma-Aldrich, USA
Peroxid vodíku (H₂O₂); Lachema, ČR
Persulfát amonný (APS); Serva Electrophoresis, SRN
PBS 10x koncentrovaný roztok, Přípravná médií ÚMG AV, ČR
Proteinový velikostní standard, barvený; Fermentas, Litva
Proteinový velikostní standard, nebarvený; Fermentas, Litva
Pyruvát sodný 1,1% sodný, Přípravná médií ÚMG AV, ČR
QCL-1000 (Quantitative chromogenic limulus amebocyte lysate); Cambrex, USA
RPMI 1640 médium, Přípravná médií ÚMG AV, ČR
Síran hořečnatý (MgSO₄); Fluka, Švýcarsko
Síran sodný (Na₂SO₄); Sigma-Aldrich, USA
Sulfanilamid; Sigma-Aldrich, USA
Thiamin; Calbiochem, SRN
Tris-Báze; Serva Electrophoresis, SRN
Tris-HCl; Serva Electrophoresis, SRN
Triton X-100; Serva Electrophoresis, SRN
Trypanová modř; Sigma-Aldrich, USA
Tween 20; Sigma-Aldrich, USA
Vanadičnan sodný (Na₃VO₄); Sigma-Aldrich, USA
West Femto Stable Peroxidase Buffer; Thermo Scientific, USA

4.1.3 Plazmidy

pT7CACT1 (Osicka *et al.*, 2000), 8.8 kpb; kódující CyaC (protein nezbytný pro posttranslační acylaci CyaA) a divoký typ toxinu CyaA; oba geny jsou pod kontrolou inducibilního *lacZ* promotoru (indukovatelného isopropyl-β-D-thyogalactopyranosidem)

pT7CACT1 E5 (Osicka *et al.*, 2000), 8.8 kpb; obsahující *lacZ* promotor a geny kódující CyaC a mutantní variantu toxinu CyaA s dipeptidovou inzercí mezi aminokyselinovými zbytky v pozicích 188 a 189 – tato mutace porušuje ATP vazebné místo, což vede ke ztrátě enzymové aktivity – neschopnosti přeměňovat ATP na cAMP

pCACT3 (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009), 8.8 kpb; obsahující *lacZ* promotor a geny kódující CyaC a protein odvozený od CyaA substituční mutací v aminokyselinových zbytcích E570 a E581 (CyaA-E570K+E581P)

pEGFP-C1, 4.7 kpb; kódující EGFP (enhanced green fluorescent protein) pod kontrolou cytomegalovirového promotoru a nesoucí rezistenci na kanamycin/neomycin

pCDNA3.1, 5.4 kpb; kódující divokou variantu proteinu Rap1 [popřípadě varianty Rap1 proteinu nesoucí jednonukleotidovou substituční mutaci Rap1G12V (CA) a Rap1 S17N (DN)] pod kontrolou cytomegalovirového promotoru a rezistenci na kanamycin/neomycin a na ampicilin

4.1.4 Seznam enzymů

EcoRI; NEB, USA

BsrGI; NEB, USA

HindIII; NEB, USA

KpnI; NEB, USA

MscI; NEB, USA

NdeI; NEB, USA

T4 DNA ligáza; NEB, USA

Phusion® polymerase; NEB, USA

RNAza; NEB, USA

XbaI; NEB, USA

4.1.5 Seznam protilátek

anti-(P-Ser 473)-Akt králičí monoklonální protilátka,

Cell Signaling Technology, USA

anti-(P-Thr 308)-Akt králičí monoklonální protilátka,

Cell Signaling Technology, USA

anti-(P-Thr 389)-p70 S6K myší monoklonální protilátka,

Cell Signaling Technology, USA

anti-(P-Ser 241)-PDK1 králičí polyklonální protilátka,

Cell Signaling Technology, USA

anti-(P-Ser 380)-PTEN králičí polyklonální protilátka,

Cell Signaling Technology, USA

anti-myší Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA

anti-králičí Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA

anti-P-(Ser/Thr)-PKA-substrátová polyklonální králičí protilátka, CST, USA

anti-beta-aktin monoklonální myší protilátka, Abcam, USA

anti-cAMP králičí protilátka, dar od A. Ullmann

4.1.6 Kultivační média

LB médium na kultivaci *E.coli*: (médium Luria-Bertani)

Bakto-trypton 10 g

Kvasničný autolyzát 5 g

NaCl 10 g

dH₂O doplnit do celkového objemu 1 000 ml

pH = 7,0 bylo nastaveno pomocí NaOH

Na přípravu LB-agaru bylo přidáno do hotového LB media 18 g/l bakto-agaru.

Sterilizace proběhla při 0.12 MPa po dobu 20 minut.

MDO (moyenne densité optique) médium na kultivaci *E.coli*:

KH₂PO₄ 1 g

K₂HPO₄ 3 g

NH₄Cl 2 g

Na₂SO₄ 0.5 g

Thiamin 10 mg

Kvasničný autolyzát 20 g

Glycerol 20 g

dH₂O doplnit do celkového objemu 1 000 ml

Sterilizace proběhla při 0.12 MPa po dobu 20 minut.

Selektivní médium obsahovalo ampicilin (50 µg/ml) nebo kanamycin (50 µg/ml).

RPMI 1640 médium

RPMI 1640 médium.....	400 ml
Glutamin (3%).....	5 ml
Glukóza (25%)	9 ml
Pyruvát sodný (1,1%).....	2,5 ml
Antibiotika (Sigma-Aldrich)	5 ml
FBS.....	50 ml

SOB médium na kultivaci superkompetentních buněk:

Bakto-trypton	2 % (w/v)
Kvasničný autolyzát.....	0.5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
dH ₂ O.....	doplnit do celkového objemu 1 000 ml

Sterilizace proběhla při 0.12 MPa po dobu 20 minut.

Ke sterilnímu médiu byly přidány sterilní roztoky solí do konečné koncentrace:

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

4.1.7 Pufry a roztoky

Barvící roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	225 ml
H ₂ O.....	225 ml

Kyselina octová..... 50 ml
Coomassie Brilliant blue G250 ... 0,5g

Blotovací pufr:

Tris-báze..... 25 mM
Glycin..... 0,2 M
Methanol 20% (v/v)

Bromfenolová modř (pro DNA elektroforézu):

Bromfenolová modř 0,25% (w/v)
Glycerol..... 40% (v/v)

Citrátový pufr:

Citrát trisodný 0,1 M
pH bylo nastaveno pomocí H_3PO_4 na 5,0

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant blue R250..... 0,01 % (w/v)
Ethanol 4,7 % (v/v)
 H_3PO_4 8,7 % (v/v)

Lyzační roztok doplněný 0,1% NP-40 (pro western blot):

NP-40 1% (v/v)
Tris-HCl pH = 8,2 20 mM
NaCl 100 mM
EDTA 10 mM
 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM
NaF 50 mM
 Na_3VO_4 1 mM
Calyculin A 50 nM

Aby bylo zabráněno proteolýze vzorku, byl lyzační roztok doplněn o Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche) v poměru 1 tableta do 10 ml roztoku (podle návodu výrobce).

Lyzační roztok pro měření makropinocytózy:

Tris-HCl = 7,0 50 mM
NaCl 150 mM
EDTA 5 mM
NP-40 0,8% (v/v)

NEB pufr 2 (10x koncentrovaný):

Tris-HCl 100 mM
MgCl₂ 100 mM
NaCl 500 mM
DTT 10 mM
pH = 7,9 při 25°C

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol 250 ml
H₂O 650 ml
Kyselina octová 100 ml

PBS:

NaCl 138 mM
KCl 3 mM
Na₂HPO₄ 12 mM
KH₂PO₄ 2 mM
pH = 7,4 bylo nastaveno pomocí HCl

PCR reakční směs:

HF pufr 10 µl
50% glycerol (v/v) 10 µl
dNTP (10 mM) 1 µl
Forward primer 1,5 µl
Reverse primer 1,5 µl
dH₂O 25 µl

Plazmid..... 0,5 µl
Phusion polymerase 0,5 µl

Roztok I:

Glukóza 50 mM
Tris-HCl pH = 8,0 25 mM
EDTA 10 mM

Roztok II:

NaOH 0,2 mM
SDS 1% (w/v)

Roztok III:

5 M octan draselný 60 ml
Ledová kyselina octová..... 11,5 ml
H₂O..... 28,5 ml

TB pufr:

HEPES 10 mM
CaCl₂ 15 mM
KCl 250 mM
pH bylo upraveno přidavkem KCl na 6,7

Ke sterilnímu pufru byl přidán sterilní roztok chloridu manganatého
do výsledné koncentrace:

MnCl₂ 55 mM

TBE pufr:

Tris-Báze 90 mM
H₃BO₃..... 90 mM
EDTA 2 mM
pH bylo upraveno přidavkem HCl na 8,3

TBS:

Tris-Báze 20 mM
NaCl 138 mM
pH bylo upraveno přidavkem HCl na 7,6

TBST:

Tris-Báze 20 mM
NaCl 138 mM
Tween 20 0,1%
pH bylo upraveno přidavkem HCl na 7,6

TC pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM
CaCl₂ 0,2 mM

TE pufr:

Tris-HCl pH = 7,5 10 mM
EDTA 1 mM

TEU pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM
EDTA 2 mM
RNAza 8 M

TN pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM
NaCl 1 M

Tris-glycinový pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 25 mM
Glycin 200 mM
SDS 0,1% (w/v)

TU pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM

Močovina 8 M

TUC pufr (pro ředění CyaA):

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM

Močovina 8 M

CaCl₂ 0,2 mM**TUN₁₂₀ pufr:**

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM

Močovina 8 M

NaCl 120 mM

TUN₂₀₀ pufr:

Tris-HCl pH = 8,0 50 mM

Močovina 8 M

NaCl 200 mM

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (5x koncentrovaný):

SDS 10% (w/v)

β-merkaptoethanol 10 mM

Glycerol..... 20% (v/v)

Tris-HCl pH = 6,8 0,2 M

Bromfenolová modř 0,05% (w/v)

4.1.8 Bakteriální kmeny

Escherichia coli BL21/pMM100 (Stratagene) pro produkci CyaA, tento kmen byl vytvořen transformací bakterií kmene *E. coli* BL21 plazmidem pMM100, který kóduje represor *lacI^q*, což brání bazální expresi z promotoru *lacZ*

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene) pro použití restriční endonukleázy neštěpící metylovanou DNA v její cílové sekvenci

Escherichia coli JM110 (Stratagene), dam^- , dcm^- , pro štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz neštěpících methylovanou DNA

4.1.9 Tkáňové linie

RAW 264.7 (ATCC – American Type Culture Collection, katalogové číslo TIB-71, USA)

Pro kultivaci RAW 264.7 makrofágů bylo použité RPMI 1640 médium (Přípravná médií ÚMG AV) doplněné o glutamin (0,03% v/v), glukózu (0,5% v/v), pyruvát sodný (0,006% v/v), antibiotika (1x koncentrovaný roztok antibiotik, Sigma-Aldrich) a 10% FBS (v/v).

V průběhu pokusu byly buňky udržovány v médiu DMEM (Přípravná médií ÚMG AV) doplněném o glutamin (0,06% v/v), glukózu (0,5% v/v), $NaHCO_3$ (0,2% v/v) a antibiotika (1x koncentrovaný roztok antibiotik, Sigma-Aldrich). Pro pokusy trvající déle než 4 hodiny byl do média přidán FBS (10% v/v).

4.2 Metodika

4.2.1 Produkce CyaA v bakteriích *E. coli* BL21/pMM 100

Bakterie *E. coli* BL21/pMM100 byly transformovány plazmidem kódujícím divokou variantu CyaA a mutované varianty bez AC aktivity (CyaA-AC⁻) respektive s dvojitou jednonukleotidovou záměnou v pozicích E570K + E581P (CyaA-E570K+E581P), které jsou popsány v kapitole 4.1.3. Transformované bakterie byly zaočkovány do 50 ml MDO media s ampicilemem v konečné koncentraci 150 μ g/ml a za stálého třepání byly kultivovány přes noc při 37°C. Z noční kultury bylo přeneseno 5 ml do 500 ml MDO média s ampicilemem o výsledné koncentraci 150 μ g/ml. Tato buněčná kultura byla inkubována za stálého třepání při 37°C. V pravidelných časových intervalech byly z rostoucí kultury odebírány 1 ml vzorky, u kterých by měřena optická denzita ve světle o vlnové délce 600 nm. Po dosažení vhodné optické denzity ($OD_{600} = 0,6$) byl k rostoucí kultuře přidán IPTG do výsledné koncentrace 1 mM, což vedlo k aktivaci *lacZ* promotoru a následné expresi CyaA.

Po indukci byla bakteriální kultura inkubována při 37°C po dobu 4 hodin pro dosažení exprese CyaA. Kultivace bakteriální kultury byla zastavena rychlým ochlazením na ledové tříšti.

Množství CyaA v bakteriální kultuře bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE (4.2.5). Po ochlazení byl z bakteriální kultury odebrán 1 ml, který byl dále centrifugován (10 000 g, 1 minuta). Následovalo odstranění supernatantu a resuspendování sedimentu ve 200 µl roztoku 8 M močoviny, ke kterému byl přidán 5x koncentrovaný vzorkový pufr pro SDS-PAGE. Vzorek byl zahřán na 95°C a poté byl analyzován na 10% polyakrylamidovém gelu pro SDS-PAGE.

4.2.2 Izolace CyaA z inkluzních tělísek

Po ochlazení byl zbytek bakteriální kultury centrifugován (6 000 g, 20 minut, 4°C), supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován ve 20 ml TC pufru. Bakterie byly sonikovány (8x, 50 W, 18 kHz, 4°C, při použití sonikačních pulzů 30 sekund, mezi kterými byla 1 minutová pauza pro ochlazení vzorku), aby došlo k dezintegraci bakteriální stěny. Bakterie, které nebyly rozbity sonikací, byly odstraněny pomocí centrifugace (4 000 g, 5 minut, 4°C). Získaný supernatant byl dále centrifugován (13 000 g, 20 minut, 4°C), aby došlo k usazení inkluzních tělísek, které obsahují CyaA. Pro odmytí bakteriálních membrán byl sediment třikrát opláchnut TUE pufrem a následně resuspendován v 6 ml TU pufru. Získaný roztok byl míchán 30 minut při pokojové teplotě a následně byl centrifugován (13 000 g, 20 minut, 4 °C).

Po získání supernatantu (močovinový extrakt CyaA) následuje purifikace CyaA pomocí iontoměničové a hydrofobní chromatografie.

Ze supernatantu bylo odebráno 20 µl pro analýzu přítomnosti CyaA pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), jak je popsáno níže (viz 4.2.5).

4.2.3 Purifikace CyaA pomocí DEAE-Sepharosy

Diethylamino ethyl konjugovaný na sepharose je často používán jako anex pro iontoměničové chromatografie – pro purifikaci záporně nabitých proteinů.

K močovinovým extraktům byl přidán NaCl do výsledné koncentrace 50 mM. Kolona obsahující DEAE-Sepharosu byla promyta 100 ml dH₂O a ekvilibrována pomocí pufru TUN₁₂₀. Na ekvilibrovanou kolonu byl nanesen močovinový extrakt CyaA. Nenavázané proteiny byly z kolony odstraněny 50 ml pufru TUN₁₂₀. Navázaný CyaA byl eluován ve frakcích pomocí 16 ml pufru TUN₂₀₀ a přítomnost CyaA v jednotlivých frakcích byla sledována pomocí reakce s činidlem podle Bradfordové. Čistota získaného CyaA byla analyzována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

4.2.4 Purifikace CyaA pomocí Phenyl-Sepharosy

CyaA purifikovaný pomocí DEAE-Sepharosy byl následně purifikován pomocí hydrofobní chromatografie na Phenyl-Sepharose. Všechny kroky této purifikace proběhly při 4 °C.

Vzorky eluované z DEAE-Sepharosy byly čtyřikrát zředěny přídatkem TN pufru a poté byly nanесeny na kolonu obsahující Phenyl-Sepharosu (která byla promyta 20 ml dH₂O a ekvilibrována 50 mM Tris-HCl pH = 8,0). Kolona poté byla střídavě třikrát promyta roztokem 60% isopropanolu v 50 mM Tris-HCl pH = 8,0 (25 ml), aby byl odmyt bakteriální LPS (Franken *et al.*, 2000), a 50 mM Tris-HCl pH = 8,0 (25 ml). CyaA byl z kolony eluován TEU puftrem (10 ml).

Celý proces purifikace CyaA na Phenyl-Sepharose byl zopakován ještě jednou, čímž došlo k efektivnějšímu odstranění bakteriálního lipopolysacharidu. Pro získání vyšší koncentrace byl CyaA eluován z kolony v 1 ml frakcích, v nichž byla jeho přítomnost prokazována reakcí s činidlem podle Bradfordové.

Vzorky eluovaného CyaA byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a výsledná koncentrace proteinů byla změřena metodou podle Bradfordové. Množství LPS přítomného v eluovaném vzorku bylo stanoveno pomocí sady „Limulus Amebocyte Lysate” (Cambrex).

4.2.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Vzorky pro analýzu pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byly smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrům pro SDS-PAGE. Následovalo zahřátí směsi na 5 minut na 95 °C a nanesení na gel složený ze zaostřovacího gelu (266 µl 30 % akrylamidu, 1,23 ml H₂O, 200 µl 1 M Tris-HCl pH = 6,8, 60 µl 10 % (w/v) SDS, 20 µl 25 % (w/v) APS a 20 µl TEMED) a separačního gelu (30 % akrylamid s H₂O v poměru závislejícím na požadované hustotě gelu, 1,87 ml 1 M Tris-HCl pH = 8,8, 50 µl 10 % (w/v) SDS, 12,5 µl 25 % (w/v) APS a 12,5 µl TEMED).

Elektroforéza (8 V/cm zaostřovacího gelu a 15 V/cm separačního gelu) (Bio-Rad Power-Pac 1000, Bio-Rad, ČR) probíhala v Tris-glycinovém pufru. Rozmístění proteinů v gelu bylo vizualizováno pomocí barvení gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue G250.

4.2.6 Stanovení koncentrace proteinů (metoda podle Bradfordové)

Metoda určování koncentrace proteinu podle Bradfordové je založena na aminokyselinovém složení proteinu, jehož koncentrace je zjišťována. Po vazbě coomasie na aromatické zbytky aminokyselin dochází ke změně zbarvení roztoku z červené na modrou. Tento proces může být změřen jako změna světelné absorbance roztoku.

Nejprve byla připravena ředící řada (0, 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) BSA standardů pro sestavení kalibrační křivky, 10 µl každého roztoku standardu nebo předředěného (10x nebo 20x) vzorku CyaA bylo přidáno k 90 µl činidla podle Bradfordové. Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě a následovalo změření absorbance směsi při 595 nm (Safire2, Taecan, Rakousko) v 96ti jamkové destičce. Koncentrace CyaA byla určena interpolací z kalibrační křivky.

4.2.7 Stanovení množství LPS

Množství LPS v purifikovaném vzorku CyaA bylo určeno pomocí sady QCL-1000 (z angl. „Quantitative chromogenic limulus amebocyte lysate“) (Cambrex).

Tato metoda je založena na schopnosti LPS aktivovat enzym, který katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu na p-nitroanilin. Obsah p-nitroanilinu může být měřen spektrofotometricky (absorbancí při 415 nm).

Pro sestrojení kalibrační křivky byla sestrojena ředící řada LPS z *E. coli*. Rozsah této řady se pohyboval v rozmezí od 0,1 do 1 EU (1 EU odpovídá přibližně 83 pg LPS). Jako kontrola pozadí byla použita voda bez LPS kontaminace. Množství LPS ve vzorcích CyaA byl měřen ve třech různých ředěních (1:10, 1:100 a 1:1000).

Měření bylo provedeno podle instrukcí výrobce. K 50 μ l vzorku bylo přidáno 50 μ l LAL (z angl. „Lymulus Amebocyte Lysate“) a směs byla inkubována 10 minut. Poté bylo přidáno 100 μ l chromogenního substrátu a následovala inkubace směsi po dobu 5 minut. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l zastavovací směsi a poté byla změřena absorbance při 415 nm (Safire2, Taecan, Rakousko). Všechny inkubace probíhaly při 37 °C.

4.2.8 Stanovení koncentrace cAMP v cytozolu buněk po jejich vystavení CyaA

Po vazbě molekuly CyaA do plazmatické membrány dochází k translokaci AC domény do cytozolu buňky, což vede k nárůstu koncentrace vnitrobuněčného cAMP. Tento proces může být měřen pomocí metody ELISA (z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“) popsané dříve (Karimova *et al.*, 1998).

Do 96ti jamkové destičky byly nasazeny makrofágy v koncentraci 150 000 buněk na jamku a byly kultivovány v RPMI 1640 médiu v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C přes noc. Médium bylo odstraněno a nahrazeno médiem DMEM. Následovalo přidání CyaA do konečné koncentrace podle legendy obrázku (obr. 19). Destička byla inkubována 30 minut v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C. Poté byla reakce zastavena přidáním roztoku HCl-Tween (50 mM HCl, 0,2% Tween 20). Destička byla inkubována 15 minut při 95 °C a následně byl přidán 150 mM imidazol. V takto získaném buněčném lysátu bylo stanoveno množství cAMP.

96ti jamková destička byla pokryta cAMP konjugovaným na BSA (4°C, přes noc) a následně třikrát promyta roztokem TBS-Tween-NaCl (50 Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20, pH = 8,0). Byla připravena ředící řada standardu cAMP pro přípravu kalibrační křivky (v rozsahu od 1 do 3 000 nM cAMP), 100 μ l každého

standardu cAMP nebo 100 μ l buněčného lyzátu bylo přeneseno do 96ti jamkové destičky pokryté konjugátem cAMP a BSA. Následně bylo přidáno 50 μ l roztoku primární protilátky (králičí IgG anti-cAMP, ředění 1:3 000) a destička byla inkubována při 4 °C přes noc. Druhý den byla destička čtyřikrát promyta roztokem TBS-Tween-NaCl. Dále bylo přidáno 100 μ l roztoku sekundární protilátky (anti-králičí, značená peroxidázou) a destička byla inkubována za stálého míchání 2 hodiny při 37 °C. Poté byla destička čtyřikrát promyta roztokem TBS-Tween-NaCl a následně bylo přidáno 100 μ l roztoku substrátu pro peroxidázu [0,03% H₂O₂ (v/v), 0,5 mg/ml OPD]. Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 2 M H₂SO₄ a následně byla změřena absorbance směsi při 492 nm.

4.2.9 Příprava superkompetentních buněk

Bakterie požadovaného kmene *E. coli* byly inkubovány na Petřino misce s LB agarem bez antibiotik při 37 °C přes noc. Poté byly zaočkovány tři kolonie do 50 ml tekutého LB média bez antibiotik a tato kultura byla inkubována při 37 °C přes noc. 5 ml noční kultury bylo přeneseno do 500 ml SOB média a médium bylo za neustálého třepání inkubováno při 30 °C do konečné optické hustoty (OD₆₀₀ = 0,6). Kultura byla usazena centrifugací (6 000 g, 10 minut, 4°C) a sediment byl dvakrát propláchnut ledovým TB pufrem. Následně bylo k bakteriální kultuře resuspendované v ledovém TB pufru po kapkách přidáno DMSO do výsledné koncentrace 7% (v/v). Po 10ti minutové inkubaci při 4 °C byly bakterie zmrazeny v tekutém dusíku a následně byly uskladněny při -80°C.

4.2.10 Transformace bakterií metodou teplotního šoku

10 μ l ligační směsi nebo 1-2 μ l roztoku plazmidové DNA bylo přidáno ke 100 μ l kompetentních bakterií požadovaného kmene *E. coli*. Suspenze byla inkubována 15 min na ledové tříšti a pak vystavena teplotnímu šoku 37 °C (ve vodní lázni) po dobu 5 min. Následovalo ochlazení bakteriální suspenze na ledové tříšti po dobu 2 min. K bakteriím po teplotním šoku byl přidán 1 ml LB média předeřátého na 37 °C. Tato suspenze pak byla inkubována při 37 °C 1 hodinu a poté byla nanesena na Petriho misce s LB

agarem obsahujícím antibiotikum podle vnesené DNA [buď Amp (100 µg/µl) nebo Km (50 µg/µl)]. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

4.2.11 Minipreparace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla získávána alkalickou lyzí bakterií obsahujících požadovaný plazmid. Do 2 ml tekutého LB média s požadovaným antibiotikem bylo zaočkováno několik kolonií a kultura byla aerobně kultivována při 37 °C přes noc. Další den bylo 1,5 ml kultury centrifugováno (10 000 g, 1 minuta), sediment byl resuspendován ve 100 µl Roztoku I a inkubován při pokojové teplotě 5 min. K této směsi bylo přidáno 200 µl Roztoku II, následovalo promíchání směsi inverzí a inkubace na ledu 5 min. Poté bylo přidáno 150 µl Roztoku III, směs byla opět promíchána inverzí a byla inkubována na ledu 15 min. Poté byla usazena centrifugací (10 000 g, 15 minut, 4 °C) a k supernatantu bylo přidáno 400 µl isopropanolu. Následovalo promíchání směsi (Vortex MS1), inkubace na ledu 10 min a opět centrifugace (10 000 g, 15 minut, 4°C). Po opláchnutí sedimente 1 ml 70% (v/v) ethanolu k němu bylo přidáno 40 µl TE pufru doplněného o pankreatickou RNAzu (µg/ml), ve kterých byl po inkubaci při 70°C po dobu 30 min resuspendován.

4.2.12 Minipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO

Minipreparace plazmidové DNA, která pro následnou manipulaci vyžaduje vyšší čistotu DNA byla provedena pomocí sady LEGO (Top-Bio). Roztok obsahující plazmidovou DNA byl připraven stejně, jako pro preparaci DNA pro běžnou práci (byly použity Roztoky I, II a III, 4.2.11). Pro dosažení podmínek umožňujících vazbu DNA na kolonu, byl k získané směsi přidán “DNA Vazebný Pufr” (Top-Bio). Směs byla nanesena na kolonu obsahující 100 µl “DNA Vazebných Partikulí” (TOP-Bio). Poté byla kolona dvakrát promyta 2 ml “Promývacího pufru” (Top-Bio). DNA byla z kolony eluována pomocí 50 µl dH₂O přehřáté na 50 °C.

4.2.13 Midipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO

Midipreparace plazmidové DNA pro transfekci makrofágů plazmidovou DNA byla provedena pomocí sady LEGO (Top-Bio). Bakteriální kultura pro namnožení plazmidové DNA byla kultivována za stálého míchání přes noc při 37 °C v 50 ml MDO média s přidaným antibiotikem podle vneseného plazmidu. Roztok obsahující plazmidovou DNA byl připraven stejně, jako pro preparaci DNA pro běžnou práci (byly použity Roztoky I, II a III, 4.2.11). Pro dosažení podmínek umožňujících vazbu DNA na kolonu, byl k získané směsi přidán “DNA Vazebný Pufr” (Top-Bio). Směs byla nanášena na kolonu obsahující 400 µl “DNA Vazebných Partikulí” (TOP-Bio). Poté byla kolona dvakrát promyta 2 ml “Promývacího pufru” (Top-Bio). DNA byla z kolony eluována pomocí 100 µl dH₂O přehřáté na 50 °C. Koncentrace a čistota získaného vzorku DNA byla proměřena spektrofotometricky.

4.2.14 Stanovení koncentrace DNA

Ze získaného vzorku DNA byly po jeho eluci z kolony odebrány 4 µl, které byly zředěny 100x destilovanou H₂O. Zředěný vzorek byl poté přenesen do kyvety z křemenného skla. Následovalo změření absorbance při 260 a 280 nm (S2100 Diode Array Spectrophotometer, Biowave, USA). Získaná data přístroj přepočte podle udaného ředění vzorku výslednou koncentraci a čistotu ($A_{260/280}$) vzorku.

4.2.15 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

Fragment DNA o požadované velikosti byl po zviditelnění pod UV lampou vyříznut z agarózového gelu. Vyříznutá část gelu byla rozpuštěna v 1 ml “DNA Vazebného Pufru” (tento pufr byl použit i pro minipreparaci DNA pomocí sady LEGO) (TOP-Bio) ve vodní lázni (50 °C). Vzniklá směs byla nanášena na kolonu obsahující “DNA Vazebné partikule” (Top-Bio). Dále se postupovalo shodně jako při minipreparaci DNA pomocí sady LEGO (viz 4.2.12).

4.2.16 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz

K roztoku plazmidové DNA (5 μ l) byl přidán NEB pufr (o složení odpovídajícím požadavkům použitého enzymu) a BSA (pokud jej použitý enzym vyžaduje). Směs byla doplněna dH₂O do požadovaného (po přidání restrikčních endonukleáz) objemu 20 μ l. Následovalo přidání restrikční endonukleázy a inkubace směsi při 37 °C po dobu tří hodin.

4.2.17 Fenol-chloroformová extrakce plazmidové DNA

Bakteriální kmen *E. coli* JM110 nekóduje funkční DNA methylační systém (dam⁻, dcm⁻). Aby bylo nespecifické degradaci zabráněno, je doporučováno doplnit běžný purifikační protokol o další krok, kterým je promývání fenolem a chloroformem. To vede k odstranění DNA štěpících enzymů.

K roztoku DNA, který byl získán z bakteriální kultury jako při minipreparaci plazmidové DNA (4.2.11) byl přidán takový objem fenolu, který odpovídá objemu roztoku DNA. Směs byla promíchána (Vortex MS1) a následně byla centrifugována (10 000 g, 2 minuty). K vodní fázi byl přidán objem chloroformu odpovídající objemu vodní fáze. Směs byla promíchána (Vortex MS1) a následně byla centrifugována (10 000 g, 2 minuty). Vodní fáze byla přenesena do nové zkumavky a byla centrifugována (10 000 g, 15 minut, 4 °C) pro odstranění kontaminujících složek buněčného lyzátu. Vysrážení DNA ze supernatantu proběhlo dle standardního protokolu (4.2.11).

4.2.18 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla použita pro přenos DNA kódující mutantní varianty proteinu Rap1 z plazmidu pCDNA3.1 do plazmidu pEGFP-C1. K tomuto účelu byly navrženy primery pro syntézu firmou Generi Bitech podle známé sekvence plazmidu pCDNA3.1:

5'-CCAAGCTTTACGTGAGTACAAGCTAGTGG jako "forward primer" a

5'- CCTCTAGACTCGAGCTAGAGC jako "reverse primer".

PCR reakce (PCRSprint, Thermo Hybaid) byly provedeny v celkovém objemu směsi 50 μ l. Nejprve byla směs inkubována 30 sekund při 98 °C pro tání dvouřetězcové plazmidové DNA. Poté proběhlo 30 cyklů samotné polymerázové reakce – vystavení směsi 98 °C v průběhu 15 sekund vede k tání šroubovice DNA, 58 °C během 15 sekund dostahuje k vazbě použitých primerů a 72 °C po dobu 30 sekund umožňuje prodlužování řetězců DNA. Po proběhnutí 30 cyklů byla směs inkubována po dobu 5 minut při 72 °C pro dokončení tvorby všech požadovaných řetězců DNA.

Složení získané směsi bylo následně analyzováno pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Z gelu byly vyříznuty fragmenty požadované velikosti. Následovala jejich izolace podle výše zmíněného popisu (4.2.15) a štěpení restrikcními endonukleázami *HindIII* a *XbaI*.

4.2.19 Elektroforéza v agarózovém gelu

Pro separaci fragmentované DNA byl použit 0,6% agarózový gel (tato hustota gelu je vhodná pro rozlišení velikostí získaných řetězců DNA) připravený z 1,8 g agarózy a 300 ml TBE pufru. Do této směsi byl přidán ethidium bromid do konečné koncentrace 0,5 μ g/ml. Suspenze byla zahřívána až do úplného roztání agarózy a vzniklý roztok byl ochlazen na 50 °C. Tekutá agaróza byla přelita do formy, kde došlo k jejímu ztuhnutí. Gel byl ponořen do TBE pufru v zařízení na elektroforézu. Ke vzorkům byl přidán 5x koncentrovaný BFB pufr a vytvořená směs byla přenesena do jamky v gelu. Jako standard byla použita DNA fága λ naštěpená restrikcí endonukleázou *PstI*. Rozštěpená DNA byla separovaná napětím 5 V/cm délky gelu. Následovalo zviditelnění separované DNA pod UV lampou.

4.2.20 Práce s buněčnou linií RAW 264.7

Buněčná linie RAW 264.7 (ATCC, USA) je odvozena od myších makrofágů infikovaných Abelsonovým virem myši leukémie. U těchto buněk ale nedochází k produkci detekovatelných virových partikulí a jsou negativní v “XC plaque formation assay” (www.atcc.org). Tato buněčná linie je plně schopna fagocytózy a pinocytózy a také produkce oxidu dusnatého po stimulaci LPS nebo INF- γ (www.atcc.org).

4.2.20.1 Příprava buněčných konzerv

Buňky byly převedeny do kompletního média RPMI 1640 a následně byly centrifugovány (130 g, 3 minuty). Sediment byl resuspendován v RPMI 1640 médiu s 50% fetálním hovězím sérem a doplněném o kryoprotektant DMSO v konečné koncentraci 5%. K resuspendování sedimentu byl použit takový objem média, aby bylo po rozmražení konzerv dosaženo asi 30% konfluency Petřino misky (přibližně 10 mil. buněk). Vzniklé konzervy byly uloženy v -80 °C maximálně po dobu půl roku.

4.2.20.2 Rozmrazování buněčných konzerv

Pro rychlé rozmražení buněčné konzervy bylo použito vodní lázně (60 °C). Buňky byly přeneseny do kompletního média RPMI 1640 a následně byly centrifugovány (130 g, 3 minuty), aby bylo odstraněno DMSO. Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v plném RPMI 1640 a přenesen do Petriho misky. Buňky byly kultivovány maximálně po dobu čtyř týdnů v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

4.2.20.3 Stanovení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce

Suspenze buněk byla nanášena na Bürkerovu komůrku a ta byla uzavřena krycím sklíčkem. Z počtu buněk ve 32 (2 x 16) polích byl spočítán průměrný počet buněk na jedno pole (o objemu 4 pl).

Celkový počet buněk v jednom mililitru média byl určen podle vzorce ($n = 2,5 \times 10^5 \times \text{průměrný počet buněk v jednom poli}$) uvedeného výrobcem komůrky.

4.2.21 Příprava lyzátu buněk *E. coli*

Pro aktivaci makrofágů v některých pokusech byly buňky inkubovány s roztokem 10% lyzátu buněk *E. coli*. Přítomnost složek bakteriálních buněk slouží k napodobení přítomnosti bakterií v průběhu infekce organismu.

Na pevné LB médium bez antibiotik byly vysety buňky kmene *E. coli* BL21/pMM100 a byly ponechány přes noc při 37 °C. Druhý den byly tři kolonie přeneseny do 50 ml tekutého LB média bez antibiotik a byly kultivovány za stálého míchání při 37 °C do dosažení požadované optické denzity ($OD_{600} = 0,6$). Následovala centrifugace (4 000 g, 5 minut, 4°C) bakteriální kultury a sediment byl resuspendován v médiu DMEM bez séra. Bakterie byly dezintegrovány sonikací, jak je popsáno výše (4.2.2). U vzniklé směsi byla určena koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové (4.2.6) a směs byla uchovávána při -20 °C. Získaný bakteriální lyzát má koncentraci 1,6 mg proteinů/ml.

4.2.22 Stanovení makropinocytózy u RAW 264.7 makrofágů

Macropinocytóza byla určena jako míra příjmu fluorescenčního markeru tak, jak bylo popsáno dříve (Kamanova *et al.*, 2008). Makrofágy byly nasazeny v kompletním RPMI 1640 médiu do 96ti jamkové destičky v koncentraci 150 000 buněk na jamku a následně byly inkubovány v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C přes noc. Původní médium bylo odstraněno a nahrazeno médiem DMEM bez séra. Makrofágy byly ponechány 2 hodiny v klidu a poté následovalo přidání CyaA do konečné koncentrace tak, jak je vyznačeno u obrázků. Současně byla přidána makropinocytická sonda podle použité metody detekce fluorescence. Makrofágy byly v roztoku CyaA a makropinocytické sondy inkubované po 30 minut v 5% CO₂ při 37 °C. Makropinocytóza byla zastavena odstraněním média a následným oplachem ledovým PBS.

Jako makropinocytické sondy byly použity Lucifer Yellow v konečné koncentraci 20 µl/ml (Molecular Probes), fluoresceinisohiokyanát (FITC) konjugovaný na dextran v konečné koncentraci 1 mg/ml (MW 4 kDa, Sigma-Aldrich) pro určování fluorescence v buněčném lyzátu nebo Cascade Blue v konečné koncentraci 20 µl/ml (Molecular Probes) pro stanovení fluorescence metodou průtokové cytometrie. Lucifer Yellow nebaly pro toto vhodná, kvůli překryvu emisních spekter s eGFP, jehož exprese byla použita jako znak transfekovaných buněk (Lucifer Yellow – ex 425nm/em 528nm, eGFP – ex 488nm/em 507). Zatímco Lucifer yellow a Cascade Blue jsou makrofágy specificky přijímány pomocí makropinocytózy, je FITC-dextran přijímán také pomocí receptorem zprostředkované endocytózy.

Fluorescence na buňky navázaného FITC-dextranu byla zhasána pomocí roztoku trypanové modři (300 µg/ml, Molecular Probes), který byl po 2 minutové inkubaci opláchnut ledovým PBS.

Pro měření makropinocytózy v buněčném lyzátu byly makrofágy lyzovány v lyzačním roztoku pro měření makropinocytózy a fluorescence pohlcené Lucifer yellow nebo FITC-dextranu byla změřena pomocí fluorometru Safire2 (Taecan, Rakousko) (405ex/580em pro Lucifer yellow nebo 483ex/525em pro FITC-dextran).

Pro analýzu makropinocytózy metodou průtokové cytometrie byly makrofágy uvolněny z destičky několikanásobným oplachem. Pro odlišení živých buněk byl k resuspendovaným buňkám přidán propidium jodid. Získaná data byla analyzována programem FlowJo. Makropinocytóza byla určena jako medián fluorescence makropinocytické sondy Cascade Blue u živých (podle míry fluorescence pohlceného propidium jodidu) buněk vykazujících expresi eGFP.

Získaná data byla opravena o fluorescenci makrofágů inkubovaných při 4 °C.

4.2.23 Měření produkce oxidu dusnatého

Produkce oxidu dusnatého byla měřena jako množství NaNO_2 v supernatantu buněčné kultury, jak bylo popsáno dříve (Chakravorty *et al.*, 2001). Po sekreci NO z makrofágů do média vzniká stabilní NaNO_2 jako konečný produkt chemické přeměny méně stabilního NO.

Makrofágy byly nasazeny do 96ti jamkové destičky v koncentraci 300 000 buněk na jamku. K makrofágům byl přidán CyaA do konečné koncentrace, jaká je vyznačena na obrázku. Buňky byly inkubovány v kompletním médiu DMEM v 5% CO_2 při 37 °C po 24 hodin. Poté bylo odebráno 100 µl supernatantu, ke kterým bylo přidáno 100 µl Griessova roztoku (1% sulfanilamid, 0,1% *N*-(1-naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid, 2,5% kyselina orthofosforečná). Po 10 minutách následovalo změření absorbance roztoku při 570 nm (Fluorometr Safire2, Taecan, Rakousko). Koncentrace NaNO_2 byla určena podle absorbance kalibrační křivky roztoku NaNO_2 o známé koncentraci.

4.2.24 Western blot

Makrofágy byly nasazeny do 6ti jamkové destičky v koncentraci 1,5 milionu buněk na jamku a byly inkubovány v kompletním RPMI 1640 v 5% CO₂ při 37 °C přes noc. Médium bylo odstraněno a makrofágy byly následně ponechány v médiu DMEM bez séra v klidu po dobu 2 hodin. Poté byly makrofágy vystaveny působení CyaA nebo jiných látek, jak je popsáno v legendě obrázků a byly inkubovány v 5% CO₂ při 37 °C po 30 minut. V případě vystavení makrofágů H-89 nebo inhibitorům fosfatáz, došlo k 30 minutové preinkubaci před přidáním CyaA. Po uplynutí doby inkubace byly makrofágy dvakrát opláchnuty ledovým PBS a byly převedeny do lyzačního roztoku pro western blot (20 mM Tris pH = 8,2, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 50 nM calyculin A a 1% NP-40). Buňky byly vystaveny lyzačnímu roztoku po dobu 15 minut.

Poté byla odstraněna buněčná jádra pomocí centrifugace (10 000 g, 1 minuta, 4 °C). Proteiny v supernatantu byly rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, jak je popsáno výše (4.2.5), a následně byly přeneseny (Semiphor, Hoefer) na nitrocelulózovou membránu. Ta byla opláchnuta nejprve destilovanou vodou a poté TBST puřem a následně byla blokována roztokem 5% mléka po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Zablockovaná membrána byla opláchnuta TBST puřem a poté byla inkubována s primární protilátkou (proti epitopu uvedenému v legendě obrázků, ředění dle informací od výrobce) při 4 °C přes noc. Druhý den byla membrána dvakrát opláchnuta za jemného míchání TBST puřem po dobu 10 minut a následně inkubována se sekundární protilátkou (ředění 1/5 000, GE Healthcare) konjugovanou s křenovou peroxidázou. Před zviditelněním sekundární protilátky byla membrána 2x opláchnuta TBST puřem. Pro zviditelnění vazby sekundární protilátky byly použity roztoky West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

Signál byl kvantifikován pomocí LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System, Fuji) a následně byl analyzován v programu AIDA 1000/1D Image Analyzer software, verze 3.28 (Raytest Isotopenmessgeraete GmbH). V tomto programu byl určen profil dráhy proteinového vzorku v gelu. V tomto profilu byl určen maximální signál sekundární protilátky (pomocí programem provedené integrace plochy signálu) a pozadí na začátku, nebo na konci profilu. Pozadí bylo odečteno signálu sekundární protilátky. Získaný signál byl normalizován na signál aktinu, aby došlo k odstranění chyby

v nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Získané hodnoty byly vztaženy k hodnotám kontrolního vzorku.

4.2.25 Transfekce RAW 264.7 makrofágů

Transfekce makrofágů byla provedena pomocí lipofekce s použitím transfekčního činidla FuGENE 6 Reagent (Roche). V průběhu transfekce byl dodržován postup navržený výrobcem a jako ideální byl určen poměr 9:1 mezi koncentrací FuGENE 6 Reagent a plazmidové DNA. Pro transfekci 150 000 makrofágů bylo použito 0,05 µg plazmidové DNA.

Do média RPMI 1640 bez séra a antibiotik byl přidán 12,5 mM HEPES a vypočítané množství FuGENE 6 Reagent. Tato směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následovalo přidání plazmidové DNA a inkubace směsi po dobu 45 minut při pokojové teplotě. Poté byla směs po kapkách přidána ke kultuře makrofágů, které byly před přidáním transfekční směsi přes noc inkubovány v kompletním médiu RPMI 1640 bez antibiotik doplněným o 12,5 mM HEPES. Před následnou analýzou byly makrofágy inkubovány 24 hodin v 5% CO₂ při 37 °C.

5 Výsledky

5.1 Produkce a purifikace rekombinantního toxinu CyaA

Pro produkci adenylátcyklázového toxinu (CyaA) byl použit bakteriální kmen *E. coli* BL21/pMM100. Tento kmen je odvozen od kmene BL21 vnesením plazmidu pMM100, který kóduje represor *lacI^q*. Do bakterií BL21/pMM100 byl transformací teplotním šokem (4.2.10) vnesen plazmid kódující CyaA pod kontrolou *lacZ* promotoru. Přítomnost *lacI^q* na plazmidu pMM100 brání bazální expresi CyaA, dokud nedojde k indukci *lacZ* promotoru pomocí přidání IPTG. Rekombinantní CyaA je produkován ve formě inkluzních tělísek, z nichž je izolován a následně purifikován.

Stejným způsobem došlo k produkci i mutantních variant CyaA – enzymaticky neaktivní, geneticky detoxifikované mutanty neschopné produkce cAMP (CyaA-AC⁻) a mutantní formy CyaA (CyaA-E570K+E581P), která je schopná vazby na receptor CD11b/CD18, ale není schopna tvořit kation selektivní kanály v plazmatické membráně cílových buněk a translokovat svoji AC doménu do cytozolu cílové buňky (4.1.3).

Před vlastní produkcí toxinu byla ověřena identita jednotlivých plazmidů pomocí restrikčního štěpení (4.2.16) a následné analýzy pomocí gelové elektroforézy (4.2.19). Očekávané velikosti fragmentů po štěpení shrnuje Tab. 1. Výsledek restrikční analýzy je zobrazen na obr. 17.

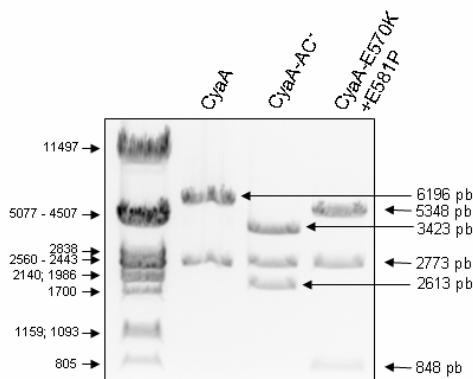
Plazmidy byly po ověření identity transfekovány (4.2.25) do bakteriálního kmene *E. coli* BL21/pMM100. Z narostlých bakteriálních kolonií byly připraveny kultury pro expresi rekombinantního toxinu CyaA. Syntéza CyaA byla indukována přidavkem IPTG (o konečné koncentraci 1 mM). Po dezintegraci bakteriálních buněk byl rekombinantní toxin extrahován z inkluzních tělísek pomocí 8 M močoviny (4.2.2) a dále purifikován iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose (4.2.3). Následně byl purifikovaný toxin zakoncentrován použitím hydrofobní chromatografie na Phenyl-Sepharose. Kolona s toxinem navázaným na Phenyl-Sepharose byla opakovaně promývána roztokem isopropanolu (60% v/v), což umožňuje odmytí bakteriálního endotoxinu (4.2.4). Tento krok je nutno zařadit, neboť bakteriální endotoxin aktivuje makrofágy, což vede k nežádoucím změnám ve vnitrobuněčné signalizaci.

Jednotlivé kroky produkce a purifikace toxinu byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (4.2.5) (obr. 18). Výsledná koncentrace purifikovaného toxinu byla určena metodou podle Bradfordové (4.2.6). Ve vzorcích byl také stanoven obsah bakteriálního

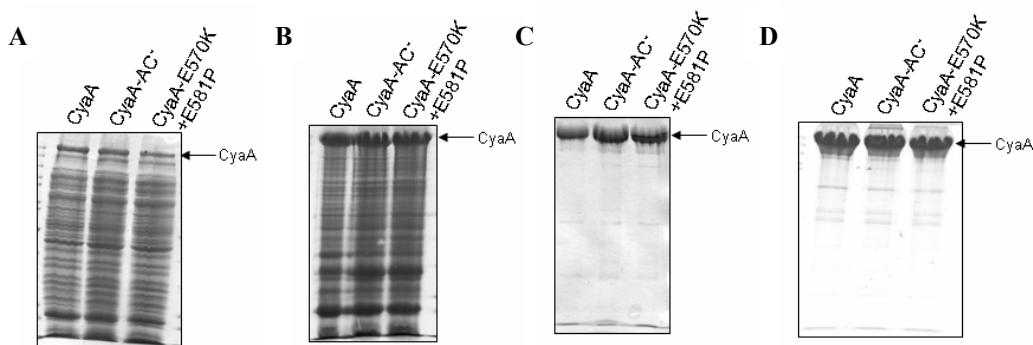
endotoxinu (4.2.7). Výslednou koncentraci toxinu a LPS v purifikovaných vzorcích shrnuje Tab. 2.

Tab. 1: Očekávané velikosti DNA fragmentů po restrikčním štěpení plazmidů.

Označení	Plazmid	Použité restrikční enzymy	Očekávaná velikost DNA fragmentů [pb]
CyaA	pT7CACT1	<i>Bsr</i> GI, <i>Eco</i> RI	6 196, 2 773
CyaA-AC ⁻	pT7CACT1-E5	<i>Bsr</i> GI, <i>Eco</i> RI	3 423, 2 773, 2613
CyaA-E570K+E581P	pCACT3	<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I	5 348, 2 773, 848



Obr. 17: Ověření identity použitých plazmidů pomocí restrikční analýzy. Plazmidy po štěpení restrikční endonukleázou (viz Tab. 1) byly analyzovány elektroforézou v agarózovém gelu. Jako velikostní standard byla použita DNA fága λ štěpená restrikční endonukleázou *Pst*I. Velikost jednotlivých fragmentů DNA je uvedena v počtu párů bází.



Obr. 18: SDS-PAGE analýza jednotlivých kroků izolace a purifikace rekombinantních variant toxinu CyaA. (A) Analýza přítomnosti toxinu v lyzátu kultury *E. coli* BL21/pMM100. (B) Analýza přítomnosti toxinu po extrakci z inkluzních tělísek. (C) Analýza přítomnosti toxinu po purifikaci iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose. (D) Analýza přítomnosti toxinu po odstranění bakteriálního endotoxinu pomocí hydrofobní chromatografie na Phenyl-Sepharose. Přítomnost toxinu je vyznačena šipkou.

Tabulka 2: Výsledná koncentrace toxinu a LPS v purifikovaných vzorcích

Rekombinantní toxin	Výsledná koncentrace toxinu [mg/ml]	Výsledná koncentrace LPS [EU/mg proteinu]
CyaA	0,8	2
CyaA-AC ⁻	0,8	1
CyaA-E570K+E581P	0,8	4

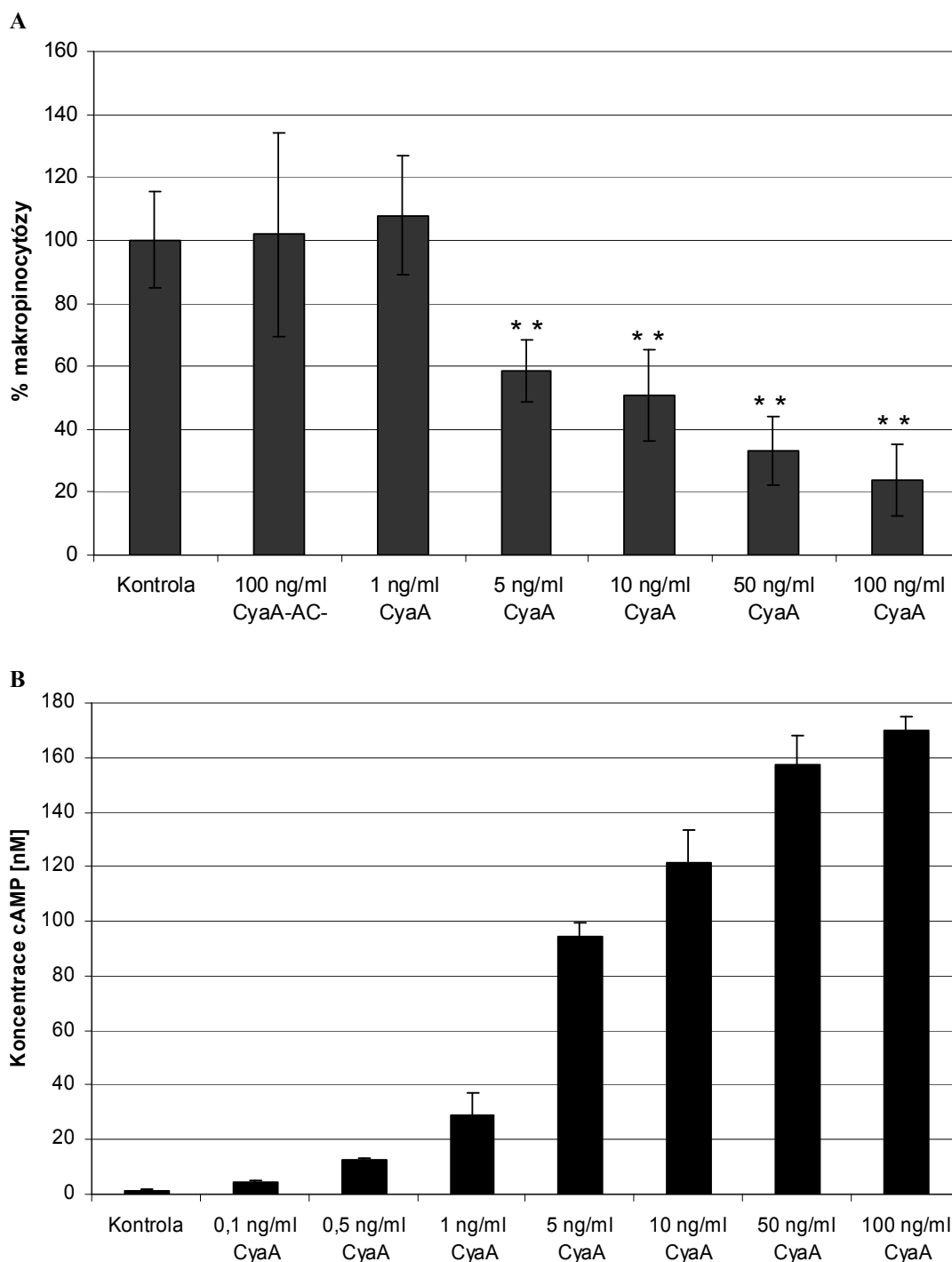
5.2 Analýza mechanismu inhibice makropinocytózy makrofágů prostřednictvím CyaA

5.2.1 Produkce cAMP toxinem CyaA inhibuje makropinocytózu

Již dříve bylo v naší laboratoři ukázáno, že CyaA blokuje proces makropinocytózy v buňkách myší makrofágové linie J774A.1, a to mechanismem závislým na tvorbě cAMP (Kamanova *et al.*, 2008). Pro tuto práci byly použity buňky myší makrofágové linie RAW 264.7, neboť buňky linie J774A.1 jsou rezistentní vůči transfekci založené na inkubaci buněk s komplexy lipidů a DNA (lipofekce).

Protože cílem práce bylo popsat signalizační kaskádu spouštěnou CyaA, která vede k inhibici makropinocytózy, bylo nejprve potřeba určit ideální koncentraci CyaA pro další práci. Z toho důvodu byl sledován vliv různých koncentrací CyaA na buněčnou makropinocytózu. Makropinocytóza byla měřena jako schopnost makrofágů pohlcovat roztok fluorescenční barvy Lucifer Yellow (4.2.22). Dále byla měřena schopnost CyaA zvyšovat hladinu cAMP v cytozolu RAW 264.7 makrofágů (4.2.8).

Z výsledků (obr. 19) je patrné, že adenylátcyklázový toxin, který není schopen přeměny ATP na cAMP (CyaA-AC⁻), nezpůsobuje inhibici makropinocytózy (příjmu Lucifer Yellow) v myší makrofágové linii RAW 264.7. Toto zjištění je v souladu s již známými výsledky (Kamanova *et al.*, 2008). Inhibice makropinocytózy odpovídá zvýšení hladiny cAMP v buněčném cytozolu. Vzhledem k tomu, že působení vysokých koncentrací CyaA vede k lyzi buněk (Basler *et al.*, 2006; Khelef *et al.*, 2001) byla pro další práci používána koncentrace 10 ng/ml CyaA.



Obr. 19: (A) Vliv CyaA na schopnost makropinocytózy RAW 264.7 makrofágů. Buňky myší makrofágové linie RAW 264.7 byly vystaveny působení CyaA o koncentraci uvedené v grafu po dobu 30 minut, zároveň s tím byla přidána sonda Lucifer Yellow (20 μ l/ml) pro měření makropinocytózy. Jako kontrola byly použity buňky inkubované s médiem bez toxinu. Procento makropinocytózy bylo měřeno jako procento fluorescence Lucifer Yellow v buněčném lyzátu. **(B) Zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP působením CyaA v RAW 264.7 makrofázích.** Makrofágy byly inkubovány 30 minut v médiu s koncentrací CyaA vyznačenou na obrázku. Koncentrace cAMP byla měřena v buněčném lyzátu metodou nepřímé ELISY. Jako kontrola byly použity buňky inkubované v médiu bez toxinu. (***) odlišnost od kontroly, $p < 0,01$ (Studentův T-test) Oba obrázky zachycují průměr ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátech, $n = 9$. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

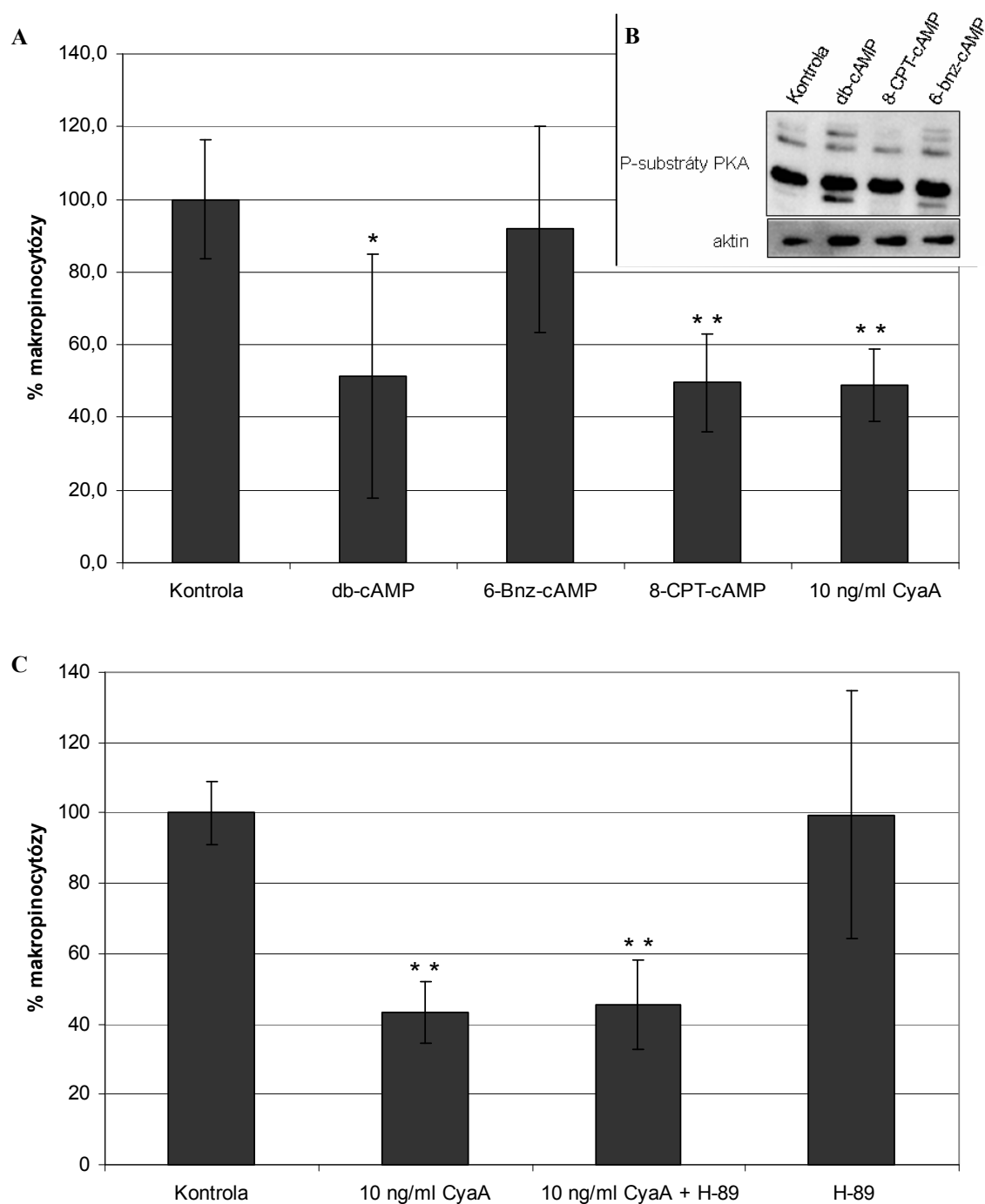
5.2.2 Inhibice makropinocytózy toxinem CyaA je zprostředkována působením proteinu Epac

Zvýšení hladiny cAMP v cytozolu makrofágů vede k aktivaci dvou významných signálních molekul – proteinové kinázy A (PKA) a proteinu Epac (z angl. „exchange protein activated by cAMP“). Abychom odlišili, která z těchto signálních molekul hraje roli v inhibici makropinocytózy způsobené působením CyaA, použili jsme membránově permeabilní, selektivní analogy cAMP pro aktivaci PKA (6-Bnz-cAMP) a proteinu Epac (8-CPT-cAMP) a membránově permeabilní nespecifický analog cAMP (db-cAMP), který aktivuje PKA i Epac.

Kontrolu specifity jednotlivých analogů cAMP jsme provedli metodou western blotu (4.2.24). Pro tuto kontrolu byla použita protilátka specificky rozeznávající fosforylované substráty PKA (4.1.5). Inkubace makrofágů s 1 mM db-cAMP, nebo 6-Bnz-cAMP vede k významné aktivaci PKA, která se projevuje nárůstem fosforylace jejích substrátů. Oproti tomu 8-CPT-cAMP není schopen PKA aktivovat (obr. 20 B).

Z výsledků vyplývá, že nespecifická aktivace PKA a proteinu Epac (pomocí 1 mM db-cAMP) velmi účinně inhibuje makropinocytózu v makrofágové linii RAW 264.7. Aktivace pouze PKA (1 mM 6-Bnz-cAMP) nevede k významnému ovlivnění makropinocytózy v této buněčné linii, zatímco aktivace signální dráhy proteinu Epac (1 mM 8-CPT-cAMP) vede k velmi podobným účinkům na makropinocytózu jako účinek adenylátcyklázového toxinu (obr. 20 A).

Jako kontrola role PKA v inhibici makropinocytózy toxinem CyaA byl použit specifický inhibitor pro PKA – H-89. Makrofágy inkubované s inhibitorem PKA (H-89) nemají významně ovlivněnou schopnost makropinocytózy. CyaA významně inhibuje makropinocytózu a inhibice PKA (inhibitorem H-89) nevede k obnovení makropinocytózy inhibované pomocí CyaA (obr. 20 C), což potvrzuje pozorování, že inhibice makropinocytózy je způsobena aktivací proteinu Epac.



Obr 20: (A) Aktivace proteinu Epac vede ke snížení makropinocytózy RAW 264.7 makrofágů. Makrofágy byly inkubovány 30 minut s 1mM roztoky membránově permeabilních analogů cAMP (db-cAMP pro nespecifickou aktivaci PKA a proteinu Epac, 6-Bnz-cAMP pro specifickou aktivaci PKA, nebo 8-CPT-cAMP pro specifickou aktivaci proteinu Epac) v přítomnosti Lucifer Yellow (20 μ l/ml), nebo s CyaA o výsledné koncentraci 10 ng/ml. Procento makropinocytózy bylo měřeno jako procento fluorescence Lucifer Yellow v buněčném lyzátu. **(B) Specifita analogů cAMP** Makrofágy byly vystaveny 30 minutové inkubaci s analogy cAMP (db-cAMP, 6-Bnz-cAMP a 8-CPT-cAMP) o výsledné koncentraci 1mM. Fosforylace substrátů PKA byla detekována v buněčných lyzátech metodou western blotu pomocí specifické protilátky. **(C) Inhibice PKA nepůsobí proti snížení makropinocytózy způsobenému CyaA.** Makrofágy byly preinkubovány 30 minut v přítomnosti 10 μ M H-89 pro inhibici PKA, poté byl přidán CyaA a Lucifer Yellow (20 μ l/ml) do výsledné koncentrace 10 ng/ml. Procento makropinocytózy bylo měřeno jako procento fluorescence v buněčném lyzátu. (**) odlišnost od kontroly, $p < 0,01$ (Studentův T-test); jako kontrola byly použity makrofágy inkubované v čistém médiu; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky

5.2.3 Aktivace proteinu Rap1 vede ke snížení schopnosti makropinocytózy, zatímco jeho inhibice makropinocytózu aktivuje

Epac (exchange protein activated by cAMP) byl původně popsán jako faktor vyměňující GDP za GTP (GEF, „guanine nucleotide exchange factor“) pro malou GTPázu Rap1 (de Rooij *et al.*, 1998). Nyní je ale známa celá řada jeho efektorových proteinů, mezi které patří například protein ARAP3 [což je GAP (GTPase activating protein) pro RhoA] (Krugmann *et al.*, 2004), nebo AF-6 (který se podílí na tvorbě „cell-cell junctions“) (Boettner *et al.*, 2000). Pro analýzu role, jakou hraje Rap1 v inhibici makropinocytózy adenylátcyklázovým toxinem jsme kromě divoké varianty proteinu Rap1 použili i mutantní varianty Rap1 s bodovými záměnami, které vedou k záměně jedné aminokyseliny (konstitutivně aktivní mutantu Rap1 G12V a dominantně negativní mutantu Rap1 S17N). Plazmidy kódující tyto mutantní proteiny jsme pomocí lipofekce vnesli do RAW 264.7 makrofágů. Abychom rozlišili makrofágy exprimující tyto mutanty, museli jsme nejprve zkonstruovat transfekční vektor, který by kodoval jednotlivé mutantní varianty proteinu Rap1 fúzované s GFP. Očekávané výsledky jednotlivých kroků přípravy plazmidů kódujících fúzní proteiny shrnuje tab. 3.

DNA mutantních variant proteinu Rap1 jsme nejprve amplifikovali pomocí PCR (4.2.18) z plazmidů kódujících mutantní varianty Rap1 nesoucí peptid z proteinu c-myc (tak zvaný „myc-tag“) (obr. 21 A). Tyto plazmidy jsme získali od spolupracující laboratoře Prof. I. Justa (Medizinische Hochschule, Hannover, SRN). Fragmenty DNA získané pomocí PCR jsme vnesli do plazmidu (4.1.3) pro expresi eGFP (enhanced green fluorescent protein) pomocí restričních endonukleáz *HindIII* a *XbaI* (4.2.16). Protože restriční endonukleáza *XbaI* je citlivá k Dam methylaci, byl tento plazmid namnožen v bakteriálním kmeni *E. coli* JM110 (4.1.8), který má inaktivovaný gen *dam* pro methylaci DNA. Provedli jsme kontrolní štěpení, jenž mělo prokázat schopnost restriční endonukleázy *XbaI* štěpit DNA v cílovém místě (obr. 21 B). Štěpený vektor a amplifikované fragmenty DNA kódující Rap1 byly spojeny ligací. Vzniklé plazmidy byly ověřeny restričním štěpením (4.2.16) (obr. 21 C) a sekvenací (obr. 21 D). Sekvence byla provedena Střediskem sekvenování DNA (MBÚ AV). Vzniklými

plazmidy byly transfekovány buňky myši makrofágové linie RAW 264.7 a po 24 hodinové expresi byly podrobeny analýze průtokovou cytometrií (4.2.22).

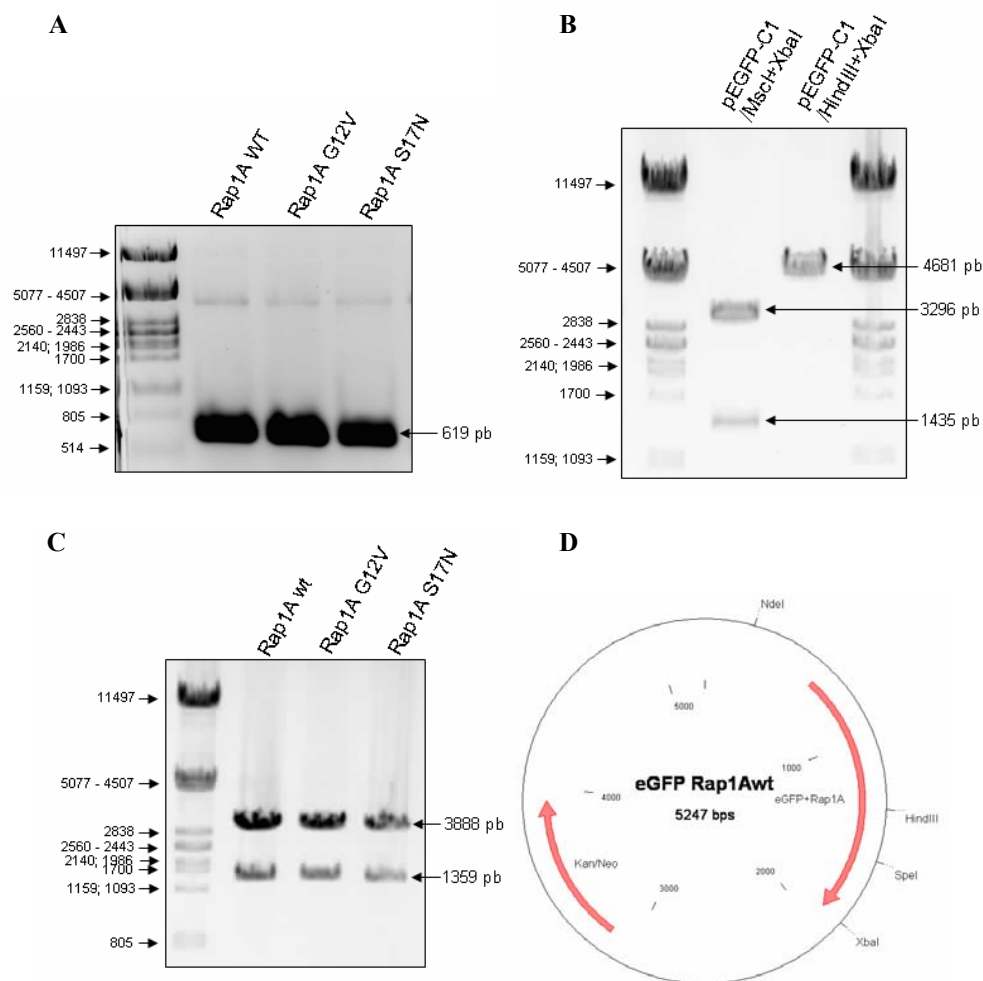
Konstitutivně aktivní mutanta proteinu Rap1 napodobuje účinek proteinu Epac po jeho aktivaci vazbou cAMP, zatímco nadprodukce dominantně negativního Rap1 brání aktivaci buněčného Rap1 a jeho následné signalizaci.

Z analýzy průtokovou cytometrií vyplývá, že oproti buňkám, které byly transfekované kontrolním vektorem nekódujícím Rap1 (prázdný vektor), dochází u buněk transfekovaných vektorem kódujícím konstitutivně aktivní mutantu proteinu Rap1 (Rap1A G12V) k významnému snížení makropinocytózy. Oproti tomu u buněk transfekovaných dominantně negativní mutantou proteinu Rap1 (Rap1A S17N) dochází ke zvýšení makropinocytózy. Efekt nadprodukce divoké varianty proteinu Rap1 není statisticky významný (Studentův T-test). Výsledky analýzy pomocí průtokové cytometrie shrnuje obr. 22.

Získané výsledky ukazují, že protein Rap1 je ve své aktivní podobě schopen inhibovat makropinocytózu.

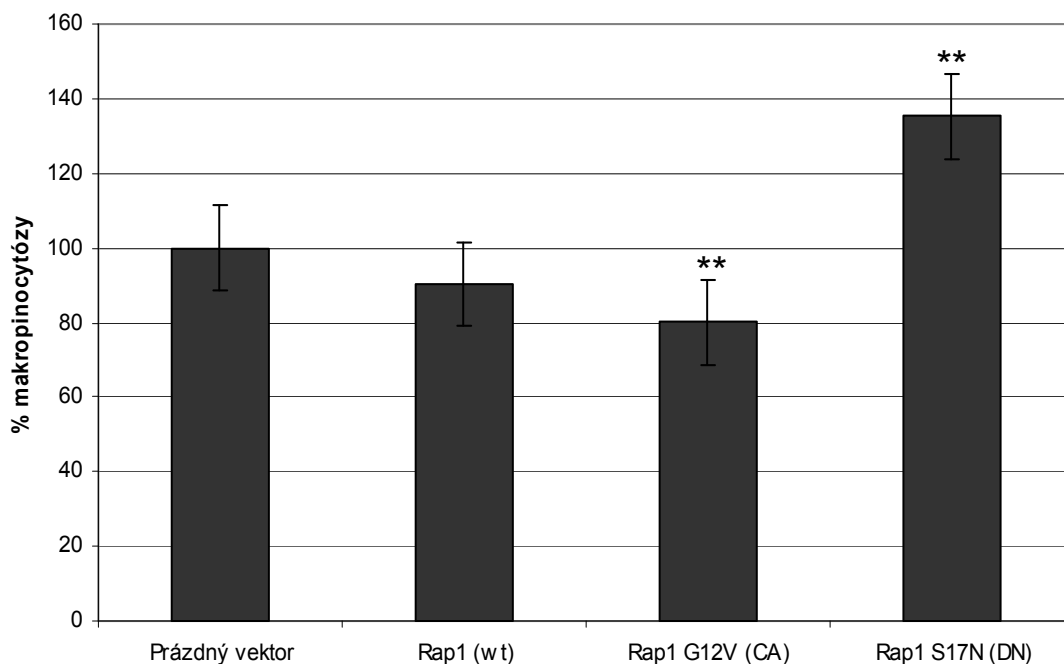
Tab. 3: Očekávané výsledky jednotlivých kroků přípravy plazmidů kódujících fúzní proteiny GFP-Rap1.

Krok	Označení	Použité restrikční enzymy	Očekávaná velikost DNA fragmentů [pb]
Amplifikace DNA kódující Rap1	Rap1 WT	<i>HindIII, XbaI</i>	619
	Rap1 G12V	<i>HindIII, XbaI</i>	619
	Rap1 S17N	<i>HindIII, XbaI</i>	619
Analýza štěpení vektoru pro vnesení DNA kódující Rap1	pEGFP-C1	<i>MscI, XbaI</i>	3296, 1435
		<i>HindIII, XbaI</i>	4681, 50
Restrikční analýza získaných plazmidů	Rap1 WT	<i>NdeI, SpeI</i>	3888, 1359
	Rap1 G12V	<i>NdeI, SpeI</i>	3888, 1359
	Rap1 S17N	<i>NdeI, SpeI</i>	3888, 1359



Obr. 21: (A) Amplifikace DNA kódující Rap1. Šipka označuje amplifikované fragmenty plazmidové DNA, které kódují protein Rap1. **(B) Analýza štěpení vektoru pro vnesení DNA kódující Rap1.** Plazmid pEGFP-C1 byl rozštěpen pomocí restričních endonukleáz *HindIII* a *XbaI*. Schopnost štěpení restriční endonukleáz *XbaI* byla ověřena pomocí štěpení plazmidu směsí endonukleáz *XbaI* a *MscI*. Vzniklé fragmenty DNA jsou znázorněny šipkami. **(C) Restriční analýza získaných plazmidů.** Štěpení bylo provedeno pomocí restričních endonukleáz *NdeI* a *SpeI*. Vzniklé fragmenty DNA jsou znázorněny šipkou. **(D) Mapa vzniklého plazmidu.** Vektor kóduje Rap1 fúzovaný na N konci s eGFP pod kontrolou cytomegalovirového promotoru a rezistenci ke kanamycinu/neomycinu pod kontrolou SV40 promotoru. Pozice, ve kterých štěpí restriční endonukleáz *NdeI*, *HindIII*, *SpeI* a *XbaI* jsou znázorněny, velikost vektoru je udána.

Jako velikostní standard byla použita DNA fága λ štěpená restriční endonukleázou *PstI*. Velikost je udána v párech bází.



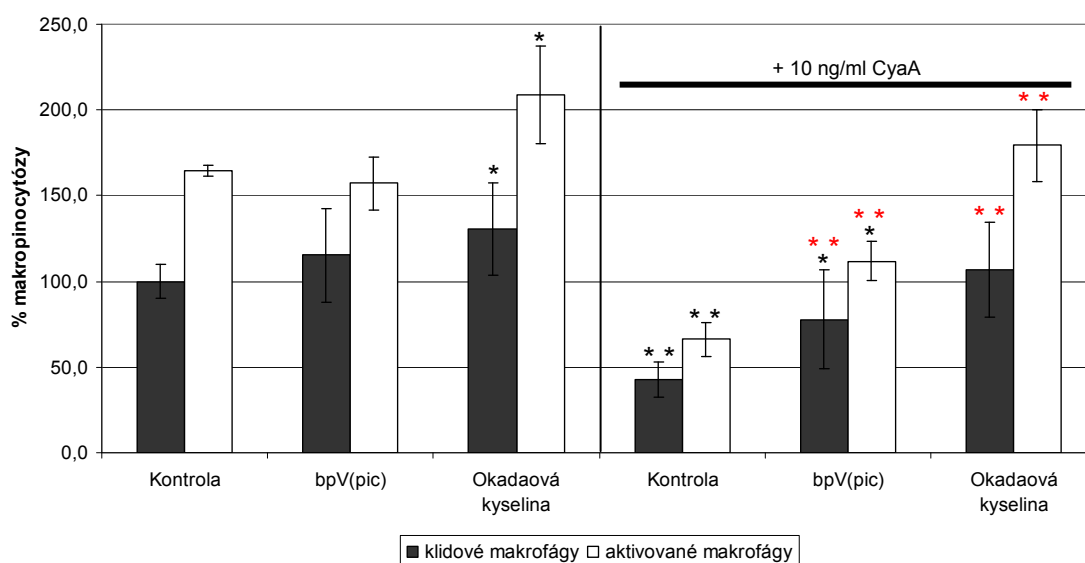
Obr. 22: Analýza ovlivnění makropinocytózy nadprodukcí mutantních forem proteinu Rap1 průtokovou cytometrií. Buňky byly transfekovány jednotlivými plazmidovými konstrukty s použitím transfekčního činidla Fugene F6. Po přidání transfekční směsi byly makrofágy ponechány pro expresi vneseného proteinu Rap1 po dobu 24 hodin. Poté byly 30 minut inkubovány s fluorescenční sondou pro měření makropinocytózy (Cascade Blue). Jako kontrolní buňky byly použité buňky transfekované vektorem kódujícím pouze eGFP (prázdný vektor). (***) odlišnost od kontroly, $p < 0,01$ (Studentův T-test). Obrázek znázorňuje průměr ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech, $n = 9$. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

5.2.4 Působení CyaA na makropinocytózu je zprostředkováno buněčnými fosfatázami

Bylo ukázáno, že zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP je schopno regulovat aktivitu buněčných fosfatáz defosforylujících tyrozinové aminokyselinové zbytky (Canetti *et al.*, 2007). Podobně je tomu u defosforylace serinových a threoninových aminokyselinových zbytků proteinovou fosfatázou 2 A (Hong *et al.*, 2008). V obou případech vede aktivace těchto fosfatáz k inhibici baktericidních mechanismů u makrofágů. Analyzovali jsme proto úlohu aktivace fosfatáz v inhibici makropinocytózy způsobené zvýšením cytozolické hladiny cAMP po přidavku adenylátcyklázového toxinu. K tomu jsme použili specifické inhibitory tyrozinových fosfatáz [bpV(pic)] a kyselinu okadaovou. Okadaová kyselina je při koncentraci 1,25 nM schopna specificky inhibovat proteinovou fosfatázu 2 A (PP2A), která defosforyluje serinové a threoninové aminokyselinové zbytky (Hong *et al.*, 2008).

Z výsledků (obr. 23) je zřejmé, že zatímco inhibice tyrozinových fosfatáz nemá vliv na makropinocytózu RAW 264.7 makrofágů, inhibice PP2A vede ke zvýšení bazální úrovně makropinocytózy jak u klidových makrofágů, tak u makrofágů aktivovaných lyzátem buněk *E. coli* (o proteinové koncentraci 1,6 mg/ml). Dále je zřejmé, že inhibice tyrozinových fosfatáz vede k částečné obnově makropinocytózy jak u klidových tak u aktivovaných makrofágů vystavených působení CyaA o koncentraci 10 ng/ml. Inhibice PP2A vede k úplné obnově makropinocytózy jak u klidových makrofágů vystavených CyaA o koncentraci 10 ng/ml, tak u makrofágů aktivovaných lyzátem připraveným z buněk *E. coli* (o proteinové koncentraci 1,6 mg/ml) a vystavených CyaA o koncentraci 10 ng/ml.

Získané výsledky nasvědčují tomu, že vliv adenylátcyklázového toxinu na makropinocytózu buněk linie RAW 264.7 je zprostředkován aktivací buněčných fosfatáz.



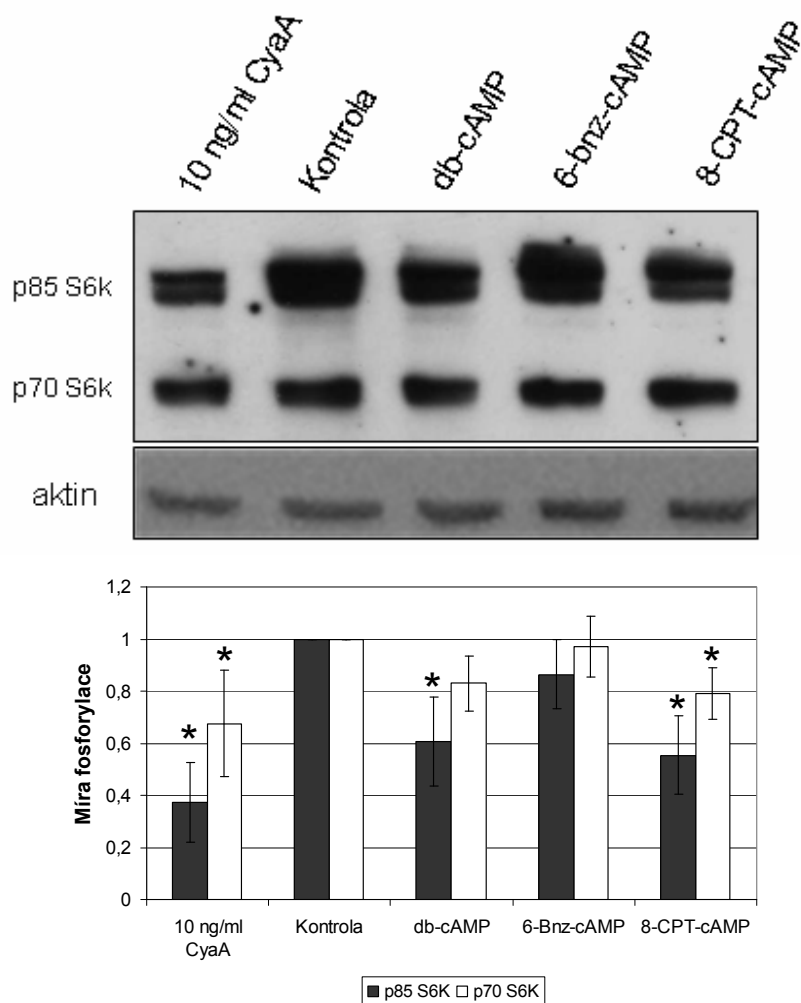
Obr. 23: Inhibice fosfatáz obnovuje makropinocytózu RAW 264.7 makrofágů inhibovanou CyaA. Buňky byly preinkubovány 30 minut se 100 nM bpV(pic) (inhibitor tyrozinových fosfatáz) případně s 1,25 nM okadaovou kyselinou (koncentrace specifická pro inhibici PP2A). Poté byl k makrofágům přidán CyaA do výsledné koncentrace 10 ng/ml. Pro aktivaci makrofágů byl přidán lyzát buněk *E. coli* do výsledné koncentrace 10% (viz metodika). Procento makropinocytózy bylo stanoveno jako procento fluorescence v buněčném lyzátu. Jako kontrola byly použity buňky inkubované bez CyaA. (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,05$ (Studentův T-test); (**) odlišnost od kontroly, $p < 0,01$ (Studentův T-test); (**) odlišnost od buněk po působení 10 ng/ml CyaA, $p < 0,01$ (Studentův T-test). Obrázek znázorňuje průměr ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

5.2.5 Působení CyaA vede k inhibici kinázy S6K

S6K kináza je jednou z mnoha kináz AGC rodiny. Na rozdíl od většiny z nich ale měla dlouho známý pouze jeden substrát. Nedávno ale bylo objeveno, že S6K je také schopna fosforylovat mTOR komplex 2 (Julien *et al.*, 2010). Je také známo, že S6K hraje roli v některých imunologicky významných pochodech, jako je například migrace (Qian *et al.*, 2004) nebo fagocytóza (Shiratsuchi a Basson, 2007). S6K je ve svém fosforylovaném stavu aktivní, k této fosforylaci dochází působením mTOR (z angl. „mammalian target of rapamycin“) komplexu 1, který je regulován velkým množstvím signálních molekul. S6K je také regulována aktivitou PP2A, která ji defosforylací deaktivuje.

Pomocí metody western blotu za použití specifických protilátek jsme sledovali stav fosforylace S6K, abychom zjistili, zda může být S6K zapojená do inhibice makropinocytózy. Použitá protilátka rozpoznává dvě varianty S6K vzniklé alternativním sestřihem. U menší sestřihové varianty o velikosti 70 kDa (p70 S6K) rozpoznává použitá protilátka Thr 389, zatímco u větší sestřihové varianty o velikosti 80 kDa (p80 S6K) rozpoznává použitá protilátka Thr 412. Obě detekovatelné izoformy S6K se od sebe liší pouze 23 aminokyselinovými zbytky exprimovanými na N-konci p80 S6K, které slouží jako jaderný lokalizační signál.

Z výsledků je patrné, že působení CyaA vede v RAW 264.7 makrofázích k defosforylaci obou izoform S6K na jejich threoninových zbytcích. Tyto aminokyselinové zbytky jsou lokalizované na spojnici katalytické a autoinhibiční domény. Této defosforylace lze dosáhnout jednak nespecifickým zvýšením vnitrobuněčného cAMP (db-cAMP) a jednak specifickou aktivací proteinu Epac (8-CPT-cAMP). Aktivace PKA ovšem nevede k defosforylaci S6K v RAW 264.7 makrofázích (obr. 24). Tyto výsledky naznačují, že inhibice S6K by mohla hrát roli v inhibici makropinocytózy. Proto budeme mechanismus inhibice S6K a její vliv na makropinocytózu dále studovat.



Obr. 24: Fosforylace S6K po vystavení RAW 264.7 makrofágů CyaA. Makrofágy byly inkubovány 30 minut s vyznačeným množstvím CyaA respektive s 1 mM membránově permeabilními analogy cAMP pro nesespecifickou aktivaci PKA a proteinu Epac (db-cAMP) a pro specifickou aktivaci PKA (6-Bnz-cAMP) a proteinu Epac (8-CPT-cAMP) Jako kontrola byly použity makrofágy inkubované bez toxinu a bez analogů cAMP. Fosforylace byla sledována pomocí specifických protilátek a detekována metodou western blotu. Přítomnost aktinu byla sledována po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Obrázek znázorňuje reprezentativní výsledek ze tří pokusů. Získaná data byla dále analyzována v programu AIDA. Graf zobrazuje průměr ze tří nezávislých experimentů. (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,05$ (Studentův T-test). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

5.3 Analýza regulace Akt kinázy prostřednictvím CyaA

5.3.1 CyaA inhibuje Akt kinázu prostřednictvím zvýšení hladiny buněčného cAMP

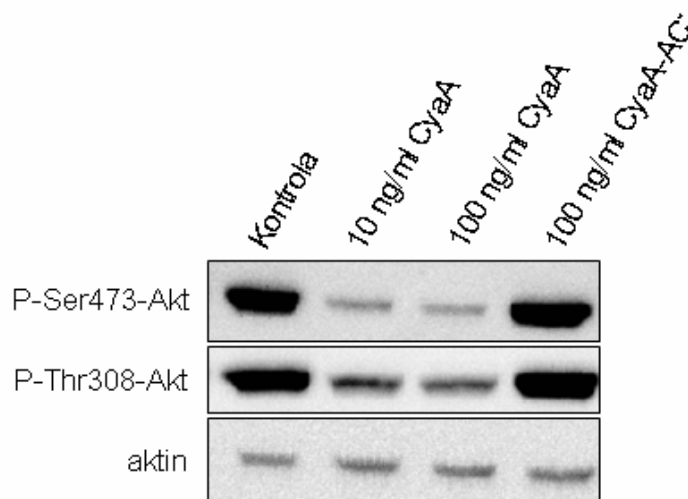
Akt kináza (jinak též proteinová kináza B, PKB) je významnou signální molekulou, která ovlivňuje velké množství buněčných pochodů pomocí změny aktivity dalších důležitých signálních molekul. Bylo například ukázáno, že Akt kináza hraje roli v inhibici fagocytózy v krysích alveolárních makrofázích (Canetti *et al.*, 2007). Je také známo, že Akt kináza fosforyluje celou řadu signálních molekul důležitých pro buňku. Tyto signální molekuly jsou kontrolovány celou řadou kontrolních mechanismů včetně defosforylace různými fosfatázami. Mezi takto řízené signální molekuly patří i mTOR komplex 1 a aktivita Akt kinázy se zde projevuje nepřímo přes TSC2.

Pro zjištění, zda je CyaA schopen inaktivovat Akt kinázu jsme použili specifické protilátky (4.1.5) proti fosforylovaným aminokyselinovým zbytkům Akt kinázy – Ser 473 a Thr 308. Fosforylace těchto zbytků je nezbytná pro aktivitu Akt kinázy. Vazbu specifických protilátek jsme detekovali pomocí metody western blot.

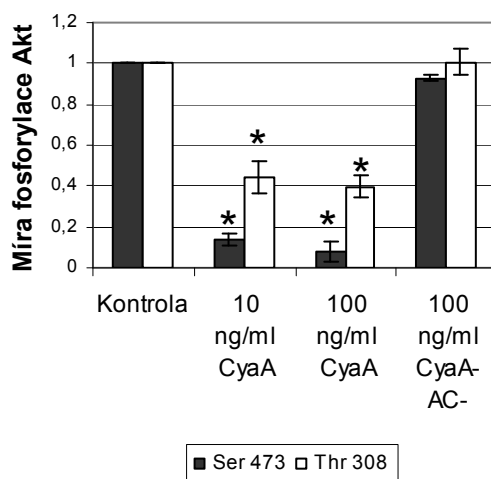
Z výsledků je patrné, že inkubace RAW 264.7 makrofágů s divokou variantou CyaA vede k defosforylaci Akt kinázy v pozici Ser 473 i Thr 308. Pokud byly buňky inkubovány s CyaA-AC⁻, která není schopna přeměňovat v cytozolu buňky ATP na cAMP, k významným změnám fosforylace Akt kinázy nedošlo (obr. 25 A). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu AIDA a výsledky analýzy byly zobrazeny v grafu (obr. 25 B).

Z popsanych výsledků lze uzavřít, že adenylátcyklázový toxin je schopen inhibovat Akt kinázu v závislosti na tvorbě cAMP z ATP.

A



B



Obr. 25: Působení CyaA na RAW 264.7 makrofágy vede k defosforylaci Akt kinázy. (A) Detekce změn fosforylace metodou western blotu. Makrofágy byly inkubovány 30 minut s vyznačenou koncentrací toxinu. Jako kontrola byly použity buňky inkubované v médiu bez toxinu. Fosforylace aminokyselinových zbytků byla sledována v buněčných lyzátech metodou western blotu. Fosforylace Thr 308 nebo množství aktinu bylo sledováno po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Obrázek znázorňuje reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů. **(B) Analýza dat získaných metodou western blotu v programu AIDA.** Míra fosforylace Akt na Ser 473 respektive Thr 308 byla srovnána k množství aktinu a následně normalizována k fosforylaci kontrolních buněk. Obrázek zobrazuje průměr ze tří nezávislých experimentů.

(*) odlišnost od kontroly, $p < 0,05$ (Studentův T-test). Obrázek znázorňuje průměr ze tří nezávislých experimentů, $n = 3$. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

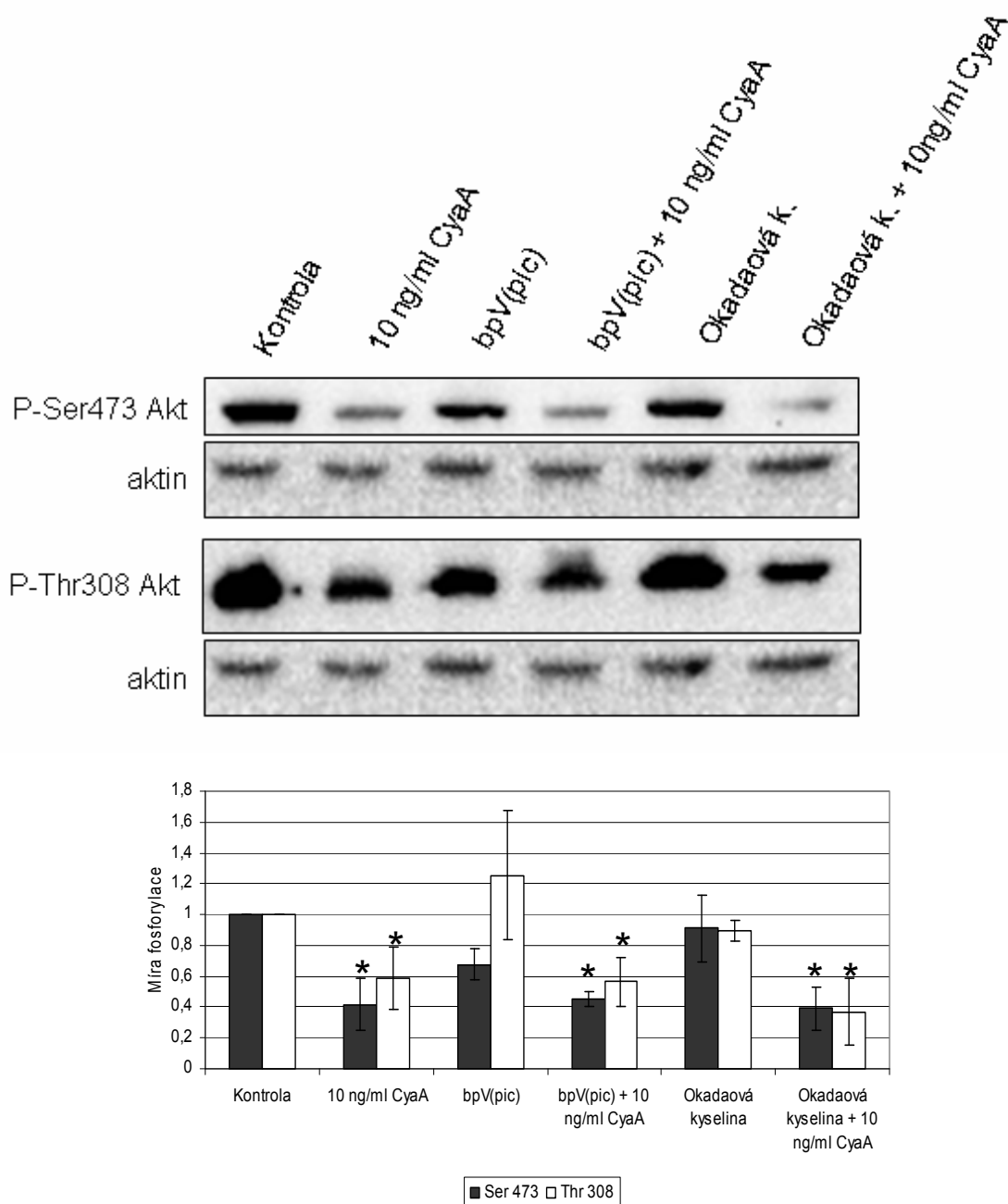
5.3.2 Akt kináza je inhibována procesem odlišným od inhibice makropinocytózy a není ovlivněna inhibicí fosfatáz

Aktivita Akt kinázy může být ovlivňována působením buněčných fosfatáz. Je například známo, že aktivita Akt kinázy může být přímo ovlivňována aktivitou PP2A (Cazzolli *et al.*, 2001). Krom toho je aktivita Akt kinázy ovlivněna také množstvím fosfatidylinositol(3,4,5)-trisfosfátu (PIP3) v membráně buněk. Tento může být rozkládán duální tyrozinovou fosfatázou PTEN, jejíž aktivita je ovlivněna některými dalšími tyrozinovými fosfatázami.

Rozhodli jsme se proto sledovat změny ve fosforylaci Akt po inhibici tyrozinových fosfatáz a po inhibici PP2A, abychom ověřili, zda jsou v účinku CyaA na aktivaci Akt zapojené buněčné fosfatázy, podobně jako v mechanismu působení CyaA na makropinocytózu.

Z výsledků (obr. 26) je zřejmé, že zatímco inhibice PP2A u RAW 264.7 makrofágů výrazně neovlivňuje hladinu fosforylace Akt kinázy, inhibice tyrozinových fosfatáz vede k částečné defosforylaci Akt na Ser 473. Působení CyaA v RAW 264.7 makrofázích vede k výrazné defosforylaci Akt. Defosforylace Akt po působení CyaA na makrofágy není významně ovlivněna inhibicí tyrozinových fosfatáz ani PP2A.

Lze tedy uzavřít, že v inhibici Akt kinázy způsobené účinkem CyaA nehraje aktivace tyrozinových fosfatáz ani PP2A významnou úlohu. Na rozdíl od inhibice makropinocytózy je tedy defosforylace Akt pravděpodobně způsobena jiným mechanismem.

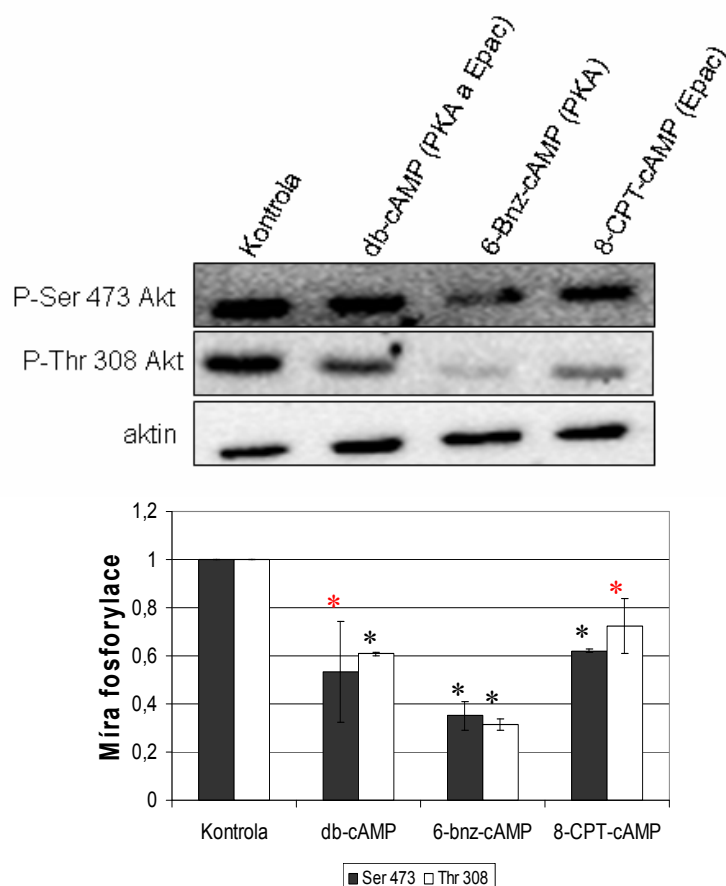


Obr. 26: Inhibice tyrozínových fosfatáz a PP2A nevede k obnově fosforylace Akt po působení CyaA na RAW 264.7 makrofágy. Buňky byly preinkubovány 30 minut se 100 nM bpV(pic) pro inhibici tyrozínových fosfatáz, nebo s 1,25 nM okadaovou kyselinou pro inhibici PP2A. Poté byl přidán CyaA do koncentrace 10 ng/ml. Jako kontrola byly použité buňky inkubované v médiu bez toxinu a inhibitorů fosfatáz. Fosforylace byla detekována pomocí specifické protilátky metodou western blot. Přítomnost aktinu byla sledována po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Obrázek zachycuje reprezentativní experiment ze tří opakování. Získaná data byla dále analyzována v programu AIDA. Graf znázorňuje průměr ze tří nezávislých experimentů, n = 3. (*) odlišnost od kontroly, p < 0,05 (Studentův T-test). Chybové úsečky znázorňují rozptyl pozorování.

5.3.3 Akt kináza je inhibována působením PKA i proteinu Epac

Z výše zmíněných výsledků vyplývá, že Akt je působením CyaA inhibována pomocí mechanismu odlišného od inhibice makropinocytózy. Rozhodli jsme se proto zjistit, zda je Akt kináza inhibována působením PKA nebo proteinu Epac. Použili jsme membránově permeabilní analoga cAMP selektivní pro PKA (6-Bnz-cAMP) nebo protein Epac (8-CPT-cAMP) a neselektivní analog db-cAMP.

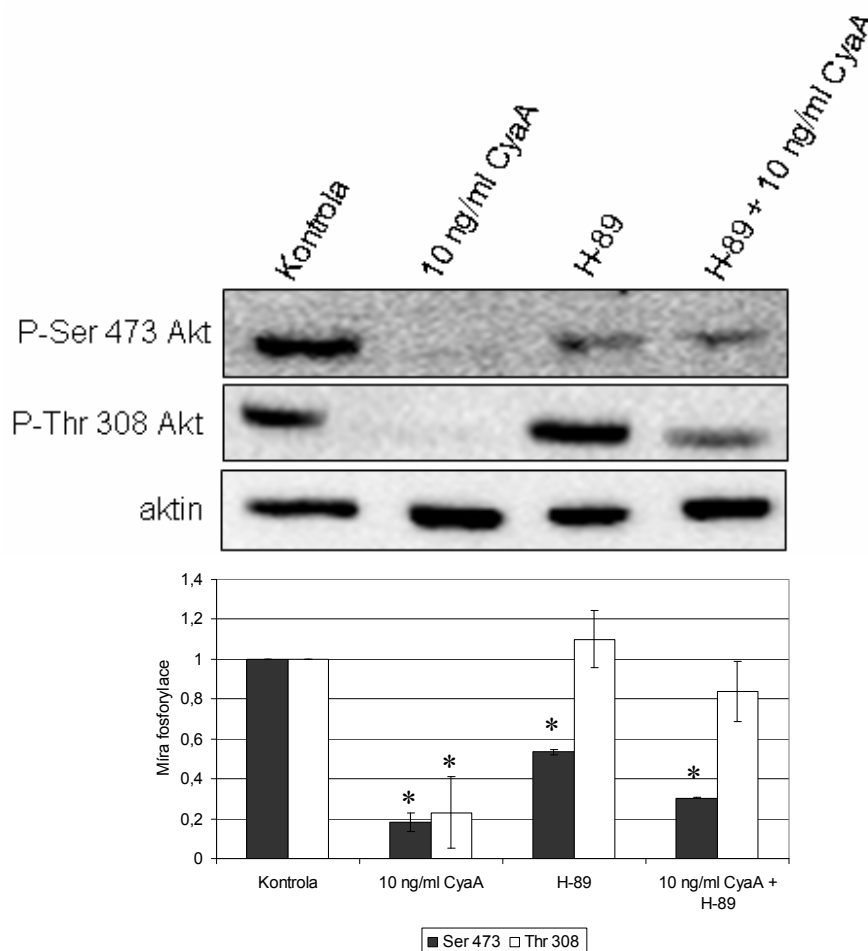
Z výsledků analýzy pomocí metody western blotu (4.2.24) vyplývá, že zvýšení hladiny cAMP v cytozolu RAW 264.7 makrofágů vede ke snížení fosforylace Akt na Ser 473 i na Thr 308 (5.3.1). Specifická aktivace PKA vede po 30 minutách k výrazné defosforylaci Akt kinázy na Ser 473 i Thr 308, podobně aktivace proteinu Epac vede k defosforylaci jak Ser 473 tak Thr 308 (obr. 27).



Obr. 27: Aktivace PKA i proteinu Epac vede k defosforylaci Akt. Buňky byly inkubovány 30 minut s 1mM roztokem analogů cAMP. V buněčných lyzátech byla detekována fosforylace Akt kinázy metodou western blot pomocí specifických protilátek rozpoznávajících fosforylované zbytky a jejich blízké aminokyselinové okolí. Fosforylace serinu 473 respektive množství aktinu bylo sledováno po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Míra fosforylace Akt na Ser 473 respektive Thr 308 byla vztažena k množství aktinu a následně byla normalizována k fosforylaci kontrolních buněk.

Obrázek zobrazuje průměr ze dvou nezávislých experimentů. (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,05$ (Studentův T-test). (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,1$ (Studentův T-test). Chybové úsečky znázorňují rozptyl pozorování.

Pro kontrolu působení PKA na Akt kinázu byl použit specifický inhibitor H-89. Působení inhibitoru PKA nemá žádný vliv na fosforylaci Akt na Thr 308, ale vede k částečné defosforylaci na Ser 473. Zatímco působení CyaA vede k téměř kompletní defosforylaci Akt kinázy, u buněk, ve kterých byla inhibována PKA pomocí inhibitoru H-89 a které byly inkubovány s CyaA, dochází u Akt kinázy jen k částečnému obnovení fosforylace Thr 308, fosforylace Ser 473 však není oproti působení CyaA výrazně zvýšena (obr. 28).



Obr. 28: Inhibice PKA nevede k obnovení fosforylace Akt po působení CyaA. Buňky byly 30 minut preinkubovány s 10 μ M H-89 před přidáním CyaA do konečné koncentrace 10 ng/ml. V buněčných lyzátech byla detekována fosforylace Akt kinázy metodou western blot pomocí specifických protilátek rozpoznávajících fosforylované zbytky a jejich blízké aminokyselinové okolí. Fosforylace serinu 473 respektive množství aktinu bylo sledováno po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Míra fosforylace Akt na Ser 473 respektive Thr 308 byla vztažena k množství aktinu a následně byla normalizována k fosforylaci kontrolních buněk.

Obrázek zobrazuje průměr ze dvou nezávislých experimentů. (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,05$ (Studentův T-test). (*) odlišnost od kontroly, $p < 0,1$ (Studentův T-test). Chybové úsečky znázorňují rozptyl pozorování.

Získaná data z analýzy změn fosforylace Akt po účinku analogů cAMP respektive CyaA a inhibitoru PKA H-89 pomocí metody western blotu byla vyhodnocena pomocí programu AIDA a výsledky analýzy byly zobrazeny v grafech.

Získané výsledky naznačují, že fosforylaci Akt kinázy ovlivňují obě signální dráhy – jak ta vedoucí přes aktivaci PKA, tak i signální dráha proteinu Epac.

5.3.4 Působení CyaA nevede k deaktivaci PDK1 kinázy, ani ke snížení stability fosfatázy PTEN

Dále jsme se rozhodli studovat vliv CyaA na PDK1 kinázu a na duální fosfatázu PTEN (z angl. „phosphatase and tensin homolog“), které mohou také regulovat aktivitu Akt kinázy. Aktivita Akt kinázy je také závislá na aktivitě PI3K (z angl. „phosphoinositide 3-kinase“), respektive na přítomnosti produktů jejího působení – PIP3 [fosfatidylinositol(3,4,5)-trisfosfát]. Ty mohou být rozkládány působením duální fosfatázy PTEN, která může také působit jako tyrozinová fosfatáza a jejíž aktivita je mimo jiné řízena tyrozinovou fosfatázou SHP-1. Krom toho je známo, že zvýšení hladiny cAMP v cytozolu fibroblastů Swiss 3T3 vede ke změně lokalizace Akt kinázy z membránově vázané formy na cytozolickou formu, což vede k inaktivaci této kinázy (Kim *et al.*, 2001).

Akt kináza je plně aktivní až po fosforylaci Thr 308 kinázou PDK1. K této fosforylaci dochází na membráně po vazbě PH (z angl. „plecstrin homology“) domén obou kináz na PIP3. PDK1 musí být fosforylována na Ser 241, aby byla aktivní a mohla tak fosforylovat Akt kinázu.

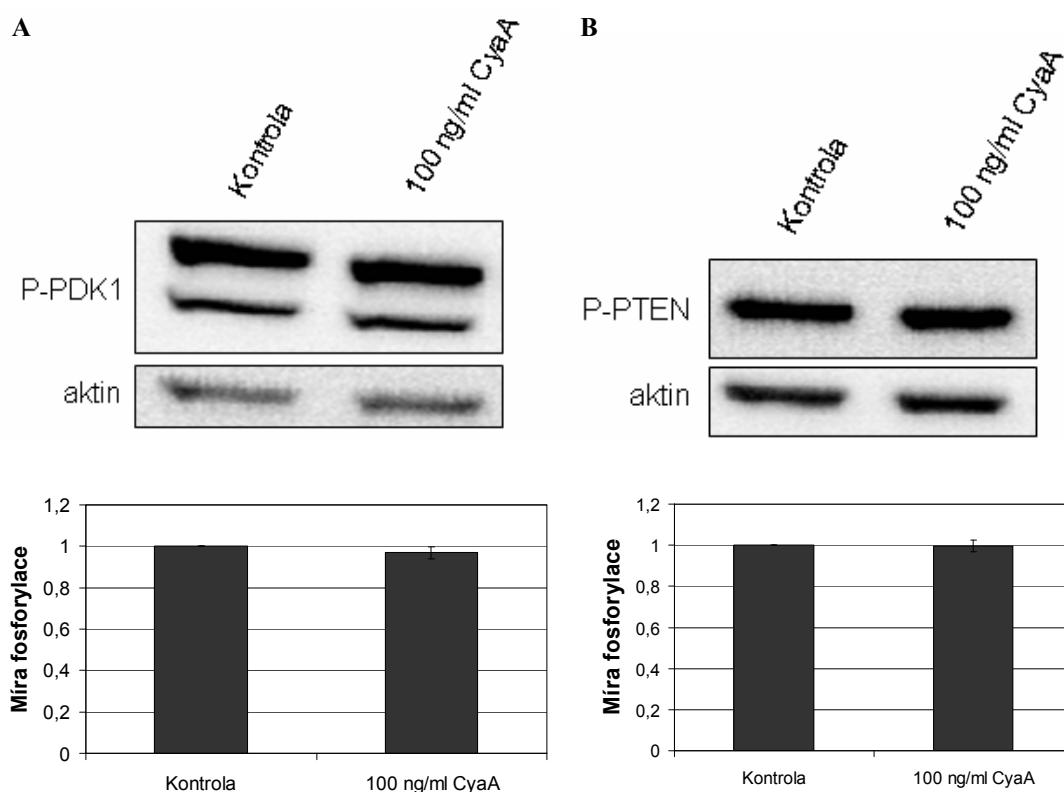
Z analýzy fosforylace PDK1 na serinu 241, po vystavení RAW 264.7 makrofágů působení CyaA, není patrná významná změna fosforylace PDK1 na serinu 241 (obr. 29 A)

PIP3 jsou v membráně tvořeny akcí PI3K a mohou být rozkládány duální fosfatázou PTEN. Fosfatáza PTEN má několik fosforylačních míst, které ovlivňují její stabilitu a aktivitu. Pokud dojde k defosforylaci serinu 380 dochází k rychlé degradaci PTEN (Vazquez *et al.*, 2000).

Z analýzy fosforylace PTEN na serinu 380 po vystavení RAW 264.7 makrofágů působení CyaA není patrná významná změna ve fosforylaci PTEN v pozici Ser 380 (obr. 29 B).

Data získaná z analýzy změn fosforylace PDK1 a PTEN byla analyzována v programu AIDA (obr. 29 A a B).

Ze získaných výsledků vyplývá, že působení CyaA nevede ke změně fosforylace PDK1 na Ser 241. Toto naznačuje, že nedochází ke změně její aktivity. Krom toho nedochází ke změně fosforylace duální fosfatázy PTEN v pozici Ser 380, což naznačuje, že nedochází ke snížení stability této fosfatázy. Uvedené výsledky tedy naznačují, že defosforylace Akt není dosažena inhibicí PDK1 ani snížením stability fosfatázy PTEN.



Obr. 29: Působení CyaA nevede ke změně fosforylace (A) PDK1 a (B) PTEN u RAW 264.7 makrofágů. Makrofágy byly inkubovány 30 minut se 100 ng/ml CyaA. V buněčných lyzátech byla specifickou protilátkou detekována fosforylace PDK1 a PTEN pomocí metody western blot. Přítomnost aktinu byla sledována po přeznačení membrány specifickou protilátkou. Obrázek znázorňuje reprezentativní výsledek ze tří experimentů. Získaná data byla analyzována pomocí programu AIDA. Grafy znázorňují průměr ze tří experimentů, $n = 3$. Chybové úsečky znázorňují rozptyl pozorování. Studentův T-test neprokázal žádné rozdíly ve fosforylaci PDK1 nebo PTEN, $p < 0,05$.

5.3.5 CyaA inhibuje produkci NO u neaktivovaných i aktivovaných makrofágů

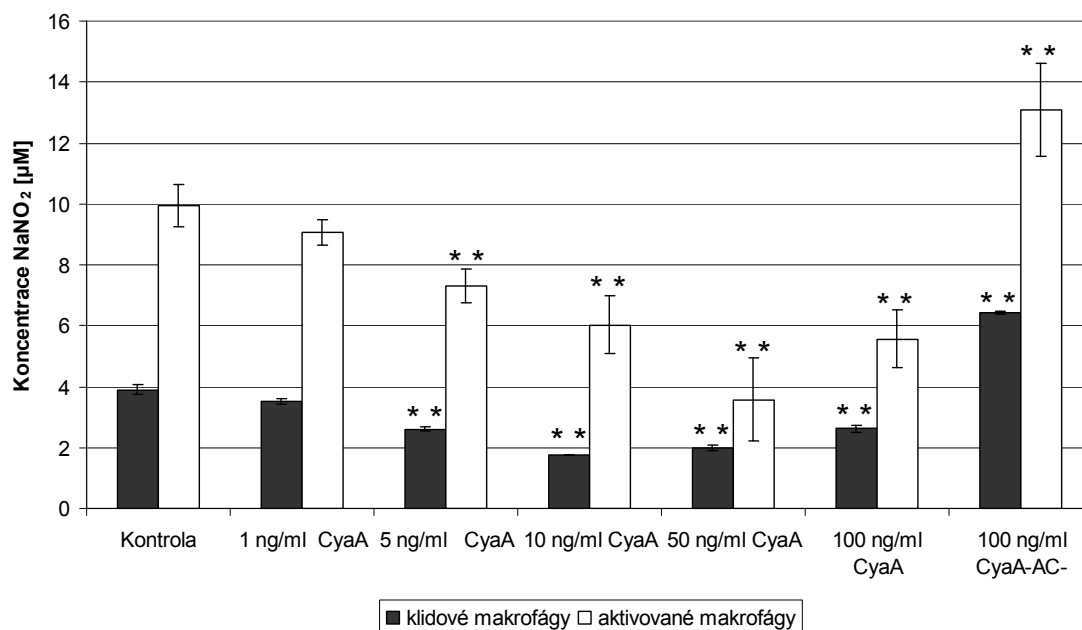
Bylo ukázáno, že inhibice Akt vede k inhibici aktivity iNOS v RAW 264.7 makrofázích (Koide *et al.*, 2003). Je také známo, že zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP vede k inhibici produkce NO u RAW 264.7 makrofágů (Gotoh a Mori, 1999).

Produkce oxidu dusnatého (NO) patří k důležitým baktericidním procesům. NO je tvořen NO syntázou (NOS), která má v savčím organismu dvě formy – konstitutivně produkovanou epiteliální formu (eNOS) a inducibilní formu (iNOS). iNOS je produkována v buňkách imunitního systému po rozpoznání konzervovaných vzorů exprimovaných patogenními organismy (např. bakteriální endotoxin), popřípadě po aktivaci imunitních buněk aktivačními cytokiny (např. INF- γ).

Abychom prověřili, zda CyaA inhibuje produkci NO u RAW 264.7 makrofágů, inkubovali jsme makrofágy s různými koncentracemi CyaA a s CyaA-AC⁻ toxoidem, který není schopen tvořit cAMP. NO je v roztoku přeměňován na stabilnější NaNO₂, který je možné detekovat reakcí s Griessovým roztokem. Při této reakci dochází ke změně zabarvení roztoku, kterou lze detekovat spektrofotometricky.

Z výsledků (obr. 30) je zřejmé, že zatímco CyaA-AC⁻ toxoid není schopen inhibovat produkci NO, nemutovaný CyaA inhibuje produkci NO v závislosti na použité koncentraci toxinu. K podobným výsledkům jsme dospěli i u makrofágů aktivovaných lyzátem *E. coli* (o proteinové koncentraci 1,6 mg/ml).

Lze tedy prohlásit, že produkce NO makrofágy RAW 264.7 je po působení CyaA inhibována zvýšením hladiny cytozolického cAMP a to pravděpodobně prostřednictvím inhibice Akt kinázy.



Obr. 30: Inhibice produkce NO makrofágy RAW 264.7 po jejich vystavení působení CyaA. Makrofágy byly inkubovány 24 hodin s vyznačenými koncentracemi CyaA variant. Produkce NO byla měřena pomocí Griessova roztoku jako změna zbarvení supernatantu makrofágové kultury. Jako kontrola byly použity makrofágy kultivované v médiu bez toxinu. Obrázek je průměrem ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech, $n = 9$. Chybové úsečky znázorňují rozptyl pozorování. (**) odlišnost od kontroly, $p < 0,01$ (Studentův T-test).

6 Diskuze

6.1 Analýza mechanismu inhibice makropinocytózy prostřednictvím CyaA

Nedávno bylo v naší laboratoři ukázáno, že působení adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* vyvolává výraznou změnu v morfologii cílových buněk a vyvolává tvorbu lamelipodií (Kamanova *et al.*, 2008). Lamelipodia pak jsou nezbytnou membránovou strukturou pro makropinocytózu. Samotná makropinocytóza je ovšem u cílových buněk po vystavených působení CyaA překvapivě snížena. K tomuto snížení dochází v důsledku zvýšení hladiny cAMP v cytozolu cílové buňky (Kamanova *et al.*, 2008). Cílem předkládané práce proto bylo navrhnout model signální dráhy, jejíž aktivace vede k popsaným efektům. Snížení makropinocytózy po působení CyaA na makrofágy bylo ukázáno i v této práci, a to jednak pomocí sledování vstupu makropinocytické sondy Lucifer Yellow do buněk (obr. 19) a jednak pomocí sledování vstupu fluoresceinisothiokyanátu (FITC) konjugovaného na dextran o molekulové váze přibližně 4 kDa (data neuvedena). Zatímco fluorescenční sonda Lucifer Yellow je do cytozolu dopravována specificky pomocí pinocytózy, FITC-dextran může být z roztoku přijímán kromě makropinocytózy také pomocí endocytózy zprostředkované vazbou na lektinové receptory.

Pomocí specifických analogů cAMP, schopných cíleně aktivovat buď PKA, nebo protein Epac, jsme ukázali, že CyaA inhibuje makropinocytózu prostřednictvím aktivace proteinu Epac. Aktivace PKA u tohoto procesu nehrála roli. Specifita použitých analogů byla prokázána již dříve (Christensen *et al.*, 2003; Enserink *et al.*, 2002) a pro účely této práce byla znovu potvrzena pomocí metody western blot (viz obr. 18 B). Námi získané výsledky byly dále potvrzeny použitím specifického inhibitoru PKA, a jsou v souladu s některými již publikovanými pracemi, které popisují rozdílné působení aktivace PKA a proteinu Epac v makrofázích (Chung *et al.*, 2008; Canetti *et al.*, 2007; Aronoff *et al.*, 2005). V budoucnu se chystáme ověřovat tyto výsledky pomocí pokusů na makrofázích transfekovaných mutantní variantou proteinu Epac, která není schopna vázat cAMP. Předpokládáme, že v makrofázích transfekovaných mutantní variantou proteinu Epac nebude CyaA schopen významně ovlivňovat makropinocytózu.

Také jsme ukázali, že exprese konstitutivně aktivního proteinu Rap1 vede v makrofázích ke snížení makropinocytózy. Tato mutantní varianta napodobuje aktivaci proteinu Rap1 proteinem Epac a tedy do jisté míry napodobuje i efekt zvýšení hladiny cAMP v cytozolu makrofágů po jejich vystavení CyaA. V souladu s tím exprese dominantně negativní varianty proteinu Rap1, která brání signalizaci buněčného Rap1, vedla ke zvýšení bazální hladiny makropinocytózy u makrofágů. Dále chceme ověřit efekt mutantních variant proteinu Rap1 na inhibici makropinocytózy způsobenou adenylátcyklázovým toxinem. Předpokládáme, že exprese dominantně negativní varianty proteinu Rap1 zruší efekt CyaA na makropinocytózu v makrofázích.

Již dříve bylo ukázáno, že aktivace proteinu Epac v makrofázích vede k aktivaci jednak tyrozínových fosfatáz (Canetti *et al.*, 2007) a jednak fosfatázy PP2A (Hong *et al.*, 2008). V této práci jsme použili specifické inhibitory těchto fosfatáz, abychom analyzovali efekt jejich inhibice na makropinocytózu. Získané výsledky nasvědčují tomu, že účinek adenylátcyklázového toxinu na makropinocytózu makrofágů je zprostředkován aktivací buněčných fosfatáz. Abychom prověřili tyto výsledky, budeme v budoucnosti analyzovat vliv CyaA na hladinu PIP3 v membráně makrofágů. Dále hodláme sledovat vliv exprese dominantně negativní varianty PP2A na makropinocytózu v makrofázích po jejich vystavení CyaA. Výsledky popsané v této práci naznačují, že působení CyaA by mohlo snižovat hladinu PIP3 v membráně makrofágů. Předpokládáme také, že exprese dominantně negativní varianty PP2A povede ke snížení efektů CyaA na makropinocytózu. Pro potvrzení aktivace fosfatázy PP2A v makrofázích vystavených účinku CyaA budeme analyzovat její aktivitu v buněčných lyzátech. Pro kontrolu, zda dochází k aktivaci fosfatáz přímo po aktivaci komplexu Epac/Rap1 by také bylo možné použít koimunoprecipitaci a následnou identifikaci získaných proteinů. Tento přístup by mohl vést i k získání dalších interakčních partnerů, kteří by se mohli podílet na efektech pozorovaných po zvýšení hladiny cAMP v cytozolu makrofágů po působení CyaA.

S6K byla popsána jako kináza fosforylující pouze S6 protein. Nedávno bylo ovšem ukázáno, že je schopna fosforylovat i další substráty (Julien *et al.*, 2010). To naznačuje, že podobně jako ostatní kinázy AGC rodiny i S6K může fosforylovat celou řadu buněčných proteinů. Protože S6K hraje roli ve fagocytóze (Shiratsuchi a Basson, 2007) a ovlivňuje svým působením migraci buněk (Qian *et al.*, 2004), rozhodli jsme se sledovat její fosforylaci po působení CyaA. Získané výsledky naznačují, že působení CyaA na makrofágy vede k defosforylaci S6K podobným způsobem, jakým

inhibuje makropinocytózu. Jedná se o mechanismus závislý na aktivaci proteinu Epac, ale nikoliv na aktivaci PKA. Toto pozorování je třeba ještě ověřit sledováním vlivu inhibice PKA na fosforylaci S6K. Je také třeba zjistit vliv inhibice buněčných fosfatáz na fosforylaci S6K po působení CyaA. Zároveň je nutné v budoucnu zjistit, zda hraje S6K roli v inhibici makropinocytózy po působení CyaA na makrofágy, například blokováním aktivace S6K mTOR komplexem 1 pomocí rapamycinu.

6.2 Analýza regulace Akt kinázy prostřednictvím CyaA

Z literatury je známo, že zvýšení hladiny cAMP v cytozolu buněk vede ke změnám aktivity Akt kinázy (Hong *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2008). Je také známo, že Akt může ovlivnit aktivitu S6K, a to nepřímo přes mTOR komplex 1. Akt je také známá svým působením na celou řadu imunologických procesů, jako jsou buněčná migrace (Shiratsuchi a Basson, 2007), fagocytóza (Canetti *et al.*, 2007; Ganesan *et al.*, 2004) nebo produkce NO (Oh *et al.*, 2008; Koide *et al.*, 2003).

Rozhodli jsme se proto sledovat změnu fosforylace Akt kinázy po vystavení makrofágů CyaA. Naše výsledky dosažené u klidových makrofágů v této práci ukazují, že zvýšení hladiny cAMP působením CyaA vede k výrazné inhibici Akt kinázy. Podobné výsledky jsme také získali u makrofágů aktivovaných 10% lyzátem bakterií *E. coli* (data neuvedena). Naše pozorování je v souladu s výsledky publikovanými v některých pracích (Hong *et al.*, 2008). Oproti tomu jiné práce ukazují aktivaci Akt po zvýšení vnitrobuněčné hladiny cAMP (Misra *et al.*, 2008). To nasvědčuje tomu, že rozdílné efekty cAMP na aktivitu Akt kinázy mohou být závislé na prostorové a časové kontrole signalizace cAMP. Kromě toho bylo ukázáno, že Akt kináza je defosforylována v důsledku působení bakteriálních toxinů tvořících kanály v plasmatické membráně cílových buněk (Wiles *et al.*, 2008). Naše výsledky ale neukazují na žádný významný efekt kanálotvorné aktivity CyaA na aktivitu Akt kinázy u makrofágů.

Již dříve bylo ukázáno, že serin v pozici 473 je u Akt kinázy fosforylován mTOR komplexem 2 (Sarbasov *et al.*, 2005). Tato pozice je snadněji přístupná pro fosfatázy než threonin v pozici 308 (Andjelkovic *et al.*, 1999) a je známo, že tento aminokyselinový zbytek je defosforylován různými serin/threoninovými fosfatázami. Naše výsledky ale neprokázaly významný efekt zkoumaných fosfatáz na působení

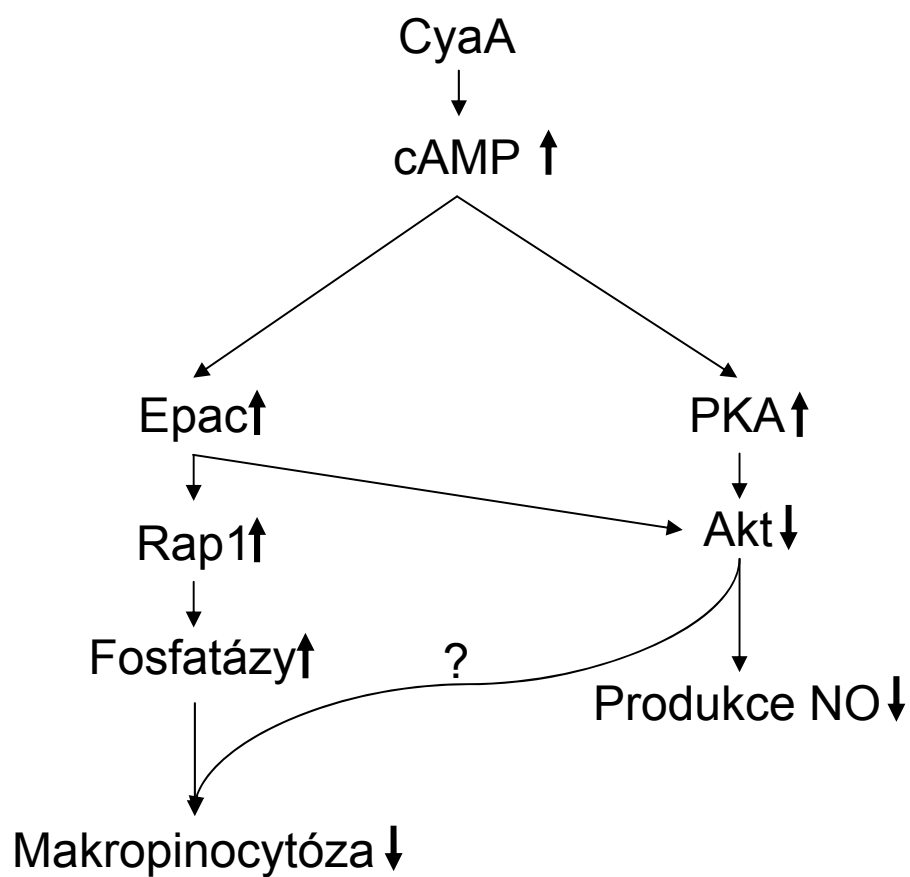
CyaA na Akt kinázu, což nasvědčuje tomu, že mechanismus inhibice makropinocytózy adenylátcyklázovým toxinem a inhibice Akt kinázy jsou dva na sobě nezávislé procesy. To je možné dále ověřit pomocí exprese dominantně negativní varianty PP2A v makrofázích před vystavením působení CyaA. Také je možné použít selektivní inhibitory pro fosfatázy, které nebyly v této práci sledovány.

Výsledky získané v průběhu této práce ukazují, že inhibice Akt kinázy vyvolaná působením CyaA v makrofázích je zprostředkována aktivací PKA a proteinu Epac. I toto pozorování ukazuje na odlišný mechanismus inhibice Akt kinázy, než který pozorujeme u inhibice makropinocytózy u makrofágů. Pro podrobnější studium vlivu jednotlivých zkoumaných signálních proteinů na Akt by šly použít obdobné metody jako pro sledování role těchto molekul v makropinocytóze. Mezi tyto metody například patří transfekce makrofágů dominantně negativní variantou proteinu Epac, imunoprecipitace jednotlivých signálních molekul, nebo umlčení exprese jednotlivých molekul použitím malých RNA (siRNA).

V předkládané práci dále ukazujeme, že působení CyaA na makrofágy nemění fosforylaci PDK1 kinázy na serinu v pozici 241, který musí být fosforylován, aby byla PDK1 kináza aktivní. Zároveň jsme nezaznamenali změnu ve stabilitě duální fosfatázy PTEN po vystavení makrofágů působení CyaA. Tyto výsledky podporují hypotézu, že působení CyaA vede ke změně hladiny PIP3 v membráně makrofágů (viz výše), což by vedlo k porušení vazby Akt kinázy na membránu. Poté by tato kináza nemohla být aktivována působením PDK1, což by mohlo vést k výslednému úbytku fosforylace na Thr 308. Toto je možné ověřit pomocí izolace membránových frakcí, ve kterých by mělo dojít ke změně množství přítomné Akt kinázy. Další možností pro ověření této hypotézy je sledování lokalizace Akt v makrofázích po působení CyaA, pomocí vazby fluorescenčně značených protilátek na cílové proteiny a následným sledováním fluorescence konfokálním mikroskopem.

Jelikož se Akt účastní regulace produkce oxidu dusnatého v makrofázích, zjišťovali jsme, zda působení CyaA na makrofágy povede k ovlivnění produkce oxidu dusnatého v těchto buňkách. Ze získaných výsledků vyplývá, že produkce NO je působením CyaA v makrofázích inhibována, a to procesem závislým na zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP.

Ze získaných výsledků lze navrhnout model signální dráhy, jejíž aktivace zvýšením hladiny cAMP v cytozolu vede k inhibici makropinocytózy a Akt kinázy u makrofágů. Tento model je znázorněn na obr. 31 a bude dále rozvíjen a ověřován.



Obr. 31: Model signalizace CyaA v makrofázích. Působením CyaA dochází v cytozolu makrofágů ke zvýšení cytozolické hladiny cAMP. To vede k aktivaci proteinu Epac a PKA. Působení proteinu Epac zvyšuje aktivitu proteinu Rap1. Působení proteinů Epac/Rap1 vede k aktivaci buněčných fosfatáz, což ve svém důsledku vede k inhibici makropinocytózy u makrofágů. Aktivní Epac společně s aktivní PKA zároveň inhibují signalizaci Akt kinázy, což vede ke snížení produkce NO z makrofágů.

7 Souhrn

Předkládaná diplomová práce si kladla za cíl charakterizovat signální kaskádu, kterou aktivuje zvýšení hladiny cytozolického cAMP po působení CyaA na RAW 264.7 makrofágy.

Byl navržen model signální dráhy, k jejíž aktivaci dochází v makrofázích RAW 264.7 zvýšením hladiny vnitrobuněčného cAMP po jejich vystavení působení adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* (obr. 31).

Podrobněji pak:

Analýza mechanismu inhibice makropinocytózy makrofágů prostřednictvím CyaA ukázala, že:

- 1) Zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP působením CyaA vede k inhibici makropinocytózy v RAW 264.7 makrofázích.
- 2) Inhibice makropinocytózy u RAW 264.7 makrofágů je zprostředkována aktivací proteinu Epac.
- 3) Byla ukázána role proteinu Rap1 na makropinocytózu. Expres konstitutivně aktivní varianty Rap1 vede ke snížení schopnosti makropinocytózy, oproti tomu exprese dominantně negativní varianty Rap1 zvyšuje makropinocytický příjem.
- 4) Buněčné tyrozínové fosfatázy a PP2A hrají roli v inhibici makropinocytózy vyvolané působením CyaA.
- 5) Aktivace proteinu Epac vede k defosforylaci S6K. Role této kinázy v makropinocytóze bude dále studována.

Analýza regulace Akt kinázy prostřednictvím CyaA prokázala, že:

- 1) Zvýšení hladiny vnitrobuněčného cAMP působením CyaA vede ke snížení úrovně fosforylace Akt kinázy.
- 2) Inhibice Akt kinázy je zprostředkována jak signalizací PKA, tak proteinu Epac.
- 3) Tyrozínové fosfatázy ani PP2A nehrají roli v inhibici Akt kinázy toxinem CyaA
- 4) Dochází k inhibici produkce NO v makrofázích vystavených působení CyaA.

8 Použitá literatura

- 1) Abrass, C.K., O'Connor, S.W., Scarpace, P.J. and Abrass, I.B. (1985) Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol.* **135**: 1338-1341.
- 2) Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. and Miller, S.I. (1994) Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med.* **179**: 601-608.
- 3) Andjelkovic, M., Maira, S.M., Cron, P., Parker, P.J. and Hemmings, B.A. (1999) Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol Cell Biol.* **19**: 5061-5072.
- 4) Araki, N., Johnson, M.T. and Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol.* **135**: 1249-1260.
- 5) Aronoff, D.M., Canetti, C., Serezani, C.H., Luo, M. and Peters-Golden, M. (2005) Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol.* **174**: 595-599.
- 6) Bachelet, M., Richard, M.J., Francois, D. and Polla, B.S. (2002) Mitochondrial alterations precede Bordetella pertussis-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **32**: 125-131.
- 7) Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Goodwin, M.S. (1991) Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol.* **173**: 720-726.
- 8) Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Hackett, M. and Sebo, P. (2001) Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of Bordetella pertussis adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J Biol Chem.* **276**: 348-354.
- 9) Basler, M., Masin, J., Osicka, R. and Sebo, P. (2006) Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun.* **74**: 2207-2214.
- 10) Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., *et al* (2007) Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem.* **282**: 12419-12429.
- 11) Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P. (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli. *J Biol Chem.* **269**: 27231-27239.
- 12) Birkebaek, N.H., Kristiansen, M., Seefeldt, T., Degn, J., Moller, A., Heron, I., *et al* (1999) Bordetella pertussis and chronic cough in adults. *Clin Infect Dis.* **29**: 1239-1242.
- 13) Boettner, B., Govek, E.E., Cross, J. and Van Aelst, L. (2000) The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 9064-9069.
- 14) Bos, J.L. (2006) Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci.* **31**: 680-686.

- 15) Boyd, A.P., Ross, P.J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E.C. and Mills, K.H. (2005) Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol.* **175**: 730-738.
- 16) Brach, M.A., deVos, S., Gruss, H.J. and Herrmann, F. (1992) Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood.* **80**: 2920-2924.
- 17) Brown, S.H., Wu, J., Kim, C., Alberto, K. and Taylor, S.S. (2009) Novel isoform-specific interfaces revealed by PKA RIIBeta holoenzyme structures. *J Mol Biol.* **393**: 1070-1082.
- 18) Canetti, C., Serezani, C.H., Atrasz, R.G., White, E.S., Aronoff, D.M. and Peters-Golden, M. (2007) Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of FcgammaR phagocytosis by prostaglandin E2 in alveolar macrophages. *J Immunol.* **179**: 8350-8356.
- 19) Caron, E., Self, A.J. and Hall, A. (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol.* **10**: 974-978.
- 20) Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J. and Schmitz-Peiffer, C. (2001) A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes.* **50**: 2210-2218.
- 21) Confer, D.L. and Eaton, J.W. (1982) Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science.* **217**: 948-950.
- 22) Cummings, C.A., Brinig, M.M., Lepp, P.W., van de Pas, S. and Relman, D.A. (2004) Bordetella species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol.* **186**: 1484-1492.
- 23) de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* **396**: 474-477.
- 24) Donaldson, J.G., Porat-Shliom, N. and Cohen, L.A. (2009) Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell Signal.* **21**: 1-6.
- 25) El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. and Leclerc, C. (2003) Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem.* **278**: 38514-38521.
- 26) Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., *et al* (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol.* **4**: 901-906.
- 27) Fairweather, D. and Cihakova, D. (2009) Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun.* **33**: 222-230.
- 28) Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spulakova, V., Konopasek, I. and Sebo, P. (2007) Third activity of Bordetella adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* **282**: 2808-2820.
- 29) Franken, K.L., Hiemstra, H.S., van Meijgaarden, K.E., Subronto, Y., den Hartigh, J., Ottenhoff, T.H. and Drijfhout, J.W. (2000) Purification of his-tagged

- proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif.* **18**: 95-99.
- 30) Friedman, R.L., Fiederlein, R.L., Glasser, L. and Galgiani, J.N. (1987) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun.* **55**: 135-140.
 - 31) Fry, N.K., Duncan, J., Malnick, H., Warner, M., Smith, A.J., Jackson, M.S. and Ayoub, A. (2005) *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg Infect Dis.* **11**: 1131-1133.
 - 32) Galea, E. and Feinstein, D.L. (1999) Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *Faseb J.* **13**: 2125-2137.
 - 33) Ganesan, L.P., Wei, G., Pengal, R.A., Moldovan, L., Moldovan, N., Ostrowski, M.C. and Tridandapani, S. (2004) The serine/threonine kinase Akt Promotes Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70S6 kinase. *J Biol Chem.* **279**: 54416-54425.
 - 34) Gao, T., Furnari, F. and Newton, A.C. (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* **18**: 13-24.
 - 35) Garcia-Perez, B.E., Hernandez-Gonzalez, J.C., Garcia-Nieto, S. and Luna-Herrera, J. (2008) Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microb Pathog.* **45**: 1-6.
 - 36) Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B. and Gross, R. (2001) Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* **3**: 61-72.
 - 37) Geuijen, C.A., Willems, R.J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H. and Mooi, F.R. (1997) Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun.* **65**: 4222-4228.
 - 38) Goodwin, M.S. and Weiss, A.A. (1990) Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun.* **58**: 3445-3447.
 - 39) Gordon, V.M., Leppla, S.H. and Hewlett, E.L. (1988) Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* **56**: 1066-1069.
 - 40) Gordon, V.M., Young, W.W., Jr., Lechler, S.M., Gray, M.C., Leppla, S.H. and Hewlett, E.L. (1989) Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J Biol Chem.* **264**: 14792-14796.
 - 41) Gotoh, T. and Mori, M. (1999) Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol.* **144**: 427-434.
 - 42) Gray, M.C., Donato, G.M., Jones, F.R., Kim, T. and Hewlett, E.L. (2004) Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* **53**: 1709-1719.
 - 43) Gross, M.K., Au, D.C., Smith, A.L. and Storm, D.R. (1992) Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 4898-4902.

- 44) Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. and Guiso, N. (1998) Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun.* **66**: 1718-1725.
- 45) Guernonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., *et al* (2001) The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* **193**: 1035-1044.
- 46) Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J. (2005) Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *Embo J.* **24**: 3190-3201.
- 47) Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hewlett, E.L. (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science.* **266**: 433-435.
- 48) Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., *et al* (1995) Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270**: 20250-20253.
- 49) Hanski, E. and Farfel, Z. (1985) *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem.* **260**: 5526-5532.
- 50) Hazes, B., Boodhoo, A., Cockle, S.A. and Read, R.J. (1996) Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor. *J Mol Biol.* **258**: 661-671.
- 51) Heiss, L.N., Lancaster, J.R., Jr., Corbett, J.A. and Goldman, W.E. (1994) Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 267-270.
- 52) Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., *et al* (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* **167**: 6533-6544.
- 53) Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V.M. and Gray, M.C. (1991) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem.* **266**: 17503-17508.
- 54) Hewlett, L.J., Prescott, A.R. and Watts, C. (1994) The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol.* **124**: 689-703.
- 55) Hong, K., Lou, L., Gupta, S., Ribeiro-Neto, F. and Altschuler, D.L. (2008) A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. *J Biol Chem.* **283**: 23129-23138.
- 56) Hu, C.D., Kariya, K., Okada, T., Qi, X., Song, C. and Kataoka, T. (1999) Effect of phosphorylation on activities of Rap1A to interact with Raf-1 and to suppress Ras-dependent Raf-1 activation. *J Biol Chem.* **274**: 48-51.
- 57) Hume, D.A. (2008) Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* **181**: 5829-5835.
- 58) Chakravorty, D., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N., Mu, M.M., Yoshida, T. and Yokochi, T. (2001) The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. *J Immunol.* **166**: 2011-2017.

- 59) Chen, C.S., Weng, S.C., Tseng, P.H. and Lin, H.P. (2005) Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem.* **280**: 38879-38887.
- 60) Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B.A. and Taylor, S.S. (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 9849-9854.
- 61) Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., *et al* (2003) cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem.* **278**: 35394-35402.
- 62) Chung, J., Serezani, C.H., Huang, S.K., Stern, J.N., Keskin, D.B., Jagirdar, R., *et al* (2008) Rap1 activation is required for Fc gamma receptor-dependent phagocytosis. *J Immunol.* **181**: 5501-5509.
- 63) Jarnaess, E. and Tasken, K. (2007) Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans.* **35**: 931-937.
- 64) Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J. and Roux, P.P. (2010) mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* **30**: 908-921.
- 65) Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., *et al* (2008) Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol.* **181**: 5587-5597.
- 66) Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C. and Ladant, D. (1998) Charge-dependent translocation of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 12532-12537.
- 67) Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. and Kinashi, T. (2003) RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol.* **4**: 741-748.
- 68) Kerr, M.C. and Teasdale, R.D. (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic.* **10**: 364-371.
- 69) Khelef, N., Sakamoto, H. and Guiso, N. (1992) Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by Bordetella pertussis to initiate infection. *Microb Pathog.* **12**: 227-235.
- 70) Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N. (1993) Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* **61**: 4064-4071.
- 71) Khelef, N., Gounon, P. and Guiso, N. (2001) Internalization of Bordetella pertussis adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage cytotoxicity. *Cell Microbiol.* **3**: 721-730.
- 72) Kim, S., Jee, K., Kim, D., Koh, H. and Chung, J. (2001) Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J Biol Chem.* **276**: 12864-12870.
- 73) Koide, N., Sugiyama, T., Mori, I., Mu, M.M., Yoshida, T. and Yokochi, T. (2003) C2-ceramide inhibits LPS-induced nitric oxide production in RAW

- 264.7 macrophage cells through down-regulating the activation of Akt. *J Endotoxin Res.* **9**: 85-90.
- 74) Krugmann, S., Williams, R., Stephens, L. and Hawkins, P.T. (2004) ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol.* **14**: 1380-1384.
 - 75) Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Nakamura, Y.O. and Matsuda, M. (2004) Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* **15**: 1003-1010.
 - 76) Ladant, D. (1988) Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem.* **263**: 2612-2618.
 - 77) Ladant, D. and Ullmann, A. (1999) Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**: 172-176.
 - 78) Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A.M., Predeleanu, R. and Barzu, O. (1989) Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *J Biol Chem.* **264**: 4015-4020.
 - 79) Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J.* **15**: 510-519.
 - 80) Laoide, B.M. and Ullmann, A. (1990) Virulence dependent and independent regulation of the Bordetella pertussis cya operon. *Embo J.* **9**: 999-1005.
 - 81) Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., *et al* (2008) The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *Embo J.* **27**: 970-981.
 - 82) Locht, C. and Antoine, R. (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie.* **77**: 333-340.
 - 83) Locht, C., Antoine, R. and Jacob-Dubuisson, F. (2001) Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol.* **4**: 82-89.
 - 84) Ma, J., Chen, T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N.E., Hukkanen, M., *et al* (2003) Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* **60**: 2334-2346.
 - 85) Magez, S., Stijlemans, B., Radwanska, M., Pays, E., Ferguson, M.A. and De Baetselier, P. (1998) The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. *J Immunol.* **160**: 1949-1956.
 - 86) Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., *et al* (2005) Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of Bordetella adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry.* **44**: 12759-12766.
 - 87) Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M. and Horiguchi, Y. (2004) Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem.* **279**: 2866-2872.
 - 88) Mattoo, S. and Cherry, J.D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to

- Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* **18**: 326-382.
- 89) Mercer, J. and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science.* **320**: 531-535.
 - 90) Misra, U.K. and Pizzo, S.V. (2005) Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling: effects of silencing CREB gene expression on Akt activation. *J Biol Chem.* **280**: 38276-38289.
 - 91) Misra, U.K., Kaczowka, S. and Pizzo, S.V. (2008) The cAMP-activated GTP exchange factor, Epac1 upregulates plasma membrane and nuclear Akt kinase activities in 8-CPT-2-O-Me-cAMP-stimulated macrophages: Gene silencing of the cAMP-activated GTP exchange Epac1 prevents 8-CPT-2-O-Me-cAMP activation of Akt activity in macrophages. *Cell Signal.* **20**: 1459-1470.
 - 92) Mordue, D.G. and Sibley, L.D. (2003) A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol.* **74**: 1015-1025.
 - 93) Morova, J., Osicka, R., Masin, J. and Sebo, P. (2008) RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 5355-5360.
 - 94) Njamkepo, E., Pinot, F., Francois, D., Guiso, N., Polla, B.S. and Bachelet, M. (2000) Adaptive responses of human monocytes infected by *bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol.* **183**: 91-99.
 - 95) O'Dorisio, M.S., Fertel, R., Finkler, E., Brooks, R. and Vassallo, L. (1984) Characterization of cyclic nucleotide metabolism during human monocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* **35**: 617-630.
 - 96) Oh, J.H., Lee, T.J., Park, J.W. and Kwon, T.K. (2008) Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* **599**: 11-17.
 - 97) Ohnishi, H., Miyake, M., Kamitani, S. and Horiguchi, Y. (2008) The morphological changes in cultured cells caused by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol Lett.* **279**: 174-179.
 - 98) Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guernonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Sebo, P. (2000) Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun.* **68**: 247-256.
 - 99) Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. and Sebo, P. (1999) An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem.* **274**: 37644-37650.
 - 100) Peters-Golden, M. (2009) Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function. *Sci Signal.* **2**: pe37.
 - 101) Pozzi, L.A., Maciaszek, J.W. and Rock, K.L. (2005) Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol.* **175**: 2071-2081.

- 102) Preston, A. (2005) *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *Cmaj*. **173**: 55-62.
- 103) Preston, A., Parkhill, J. and Maskell, D.J. (2004) The bordetellae: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol*. **2**: 379-390.
- 104) Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zheng, J.Z., Shi, X., *et al* (2004) PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. **286**: C153-163.
- 105) Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O. and Bos, J.L. (2008) Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature*. **455**: 124-127.
- 106) Rhodes, C.R., Gray, M.C., Watson, J.M., Muratore, T.L., Kim, S.B., Hewlett, E.L. and Grisham, C.M. (2001) Structural consequences of divalent metal binding by the adenylyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Arch Biochem Biophys*. **395**: 169-176.
- 107) Rogel, A. and Hanski, E. (1992) Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem*. **267**: 22599-22605.
- 108) Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D. (1995) Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem*. **270**: 26370-26376.
- 109) Ross, P.J., Lavelle, E.C., Mills, K.H. and Boyd, A.P. (2004) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun*. **72**: 1568-1579.
- 110) Rupper, A., Lee, K., Knecht, D. and Cardelli, J. (2001) Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*. **12**: 2813-2824.
- 111) Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P. and Ladant, D. (1992) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem*. **267**: 13598-13602.
- 112) Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. **307**: 1098-1101.
- 113) Sastri, M., Barraclough, D.M., Carmichael, P.T. and Taylor, S.S. (2005) A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 349-354.
- 114) Saukkonen, K., Cabellos, C., Burroughs, M., Prasad, S. and Tuomanen, E. (1991) Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med*. **173**: 1143-1149.
- 115) Sebo, P. and Ladant, D. (1993) Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol Microbiol*. **9**: 999-1009.
- 116) Shiratsuchi, H. and Basson, M.D. (2007) Akt2, but not Akt1 or Akt3 mediates pressure-stimulated serum-opsonized latex bead phagocytosis through activating mTOR and p70 S6 kinase. *J Cell Biochem*. **102**: 353-367.

- 117) Swanson, J.A. and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**: 424-428.
- 118) Sweet, M.J., Stacey, K.J., Kakuda, D.K., Markovich, D. and Hume, D.A. (1998) IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res.* **18**: 263-271.
- 119) Taylor, S.S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N.M., Yang, J., Wu, J. and Anand, G.S. (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta.* **1754**: 25-37.
- 120) Van Dop, C., Tsubokawa, M., Bourne, H.R. and Ramachandran, J. (1984) Amino acid sequence of retinal transducin at the site ADP-ribosylated by cholera toxin. *J Biol Chem.* **259**: 696-698.
- 121) Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N. and Sellers, W.R. (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* **20**: 5010-5018.
- 122) Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., *et al* (2009) Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *Faseb J.* **23**: 2831-2843.
- 123) von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R.A., Rosick, U., Gobel, U.B. and Gross, R. (2001) Bordetella petrii sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus Bordetella. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1257-1265.
- 124) Watanabe, M., Takimoto, H., Kumazawa, Y. and Amano, K. (1990) Biological properties of lipopolysaccharides from Bordetella species. *J Gen Microbiol.* **136**: 489-493.
- 125) Weingart, C.L. and Weiss, A.A. (2000) Bordetella pertussis virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun.* **68**: 1735-1739.
- 126) Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A. and Falkow, S. (1984) Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis. *J Infect Dis.* **150**: 219-222.
- 127) Weiss-Haljit, C., Pasquali, C., Ji, H., Gillieron, C., Chabert, C., Curchod, M.L., *et al* (2004) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *J Biol Chem.* **279**: 43273-43284.
- 128) Wiles, T.J., Dhakal, B.K., Eto, D.S. and Mulvey, M.A. (2008) Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell.* **19**: 1427-1438.
- 129) Worthylake, R.A. and Burridge, K. (2003) RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem.* **278**: 13578-13584.
- 130) Zaretzky, F.R., Gray, M.C. and Hewlett, E.L. (2002) Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol.* **45**: 1589-1598.
- 131) Zendegui, J.G. and Klein, T.W. (1982) Reduction in cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase activity in exudate and cultured mouse peritoneal macrophages. *J Reticuloendothel Soc.* **31**: 455-467.